

TREBALL DE RECERCA

PAPER DEL CICLE  
CEL·LULAR EN EL  
TRACTAMENT  
FARMACOLÒGIC  
DEL CÀNCER

NOHEBE

INSTITUT M.B.J

TUTORA: L.E

CURS 2021-2022

BATXILLERAT CIENTÍFIC

## **Agraïments**

En primer lloc, m'agradaria agrair al programa Bojos per la Ciència i a la Fundació la Pedrera per donar-me l'oportunitat de dur a terme aquest treball en un centre de recerca biomèdica internacional.

En segon lloc, vull agrair a l'Institut de Recerca Biomèdica per rebre'm a les seves instal·lacions i pels recursos que hi han destinat. Concretament, donar les gràcies a la C.B, investigadora de l'IRB, pel seu temps, per acollir-me en el seu laboratori i per ensenyar-me gran part d'aquest treball.

D'altra banda, també m'agradaria expressar el meu agraïment a la meva tutora, la L.E, per la seva generositat, ànims i motivació al llarg del Treball de Recerca.

Finalment, també vull agrair als meus pares el seu suport constant i incondicional.

## Abstract

The cell cycle is the essential mechanism that all cells use for their proliferation and repair. If a mutation occurs during this cycle, the daughter cell will inherit this mutation. This error can lead to the development of cancer, a disease that causes uncontrolled cell proliferation that potentially invades and destroys the surrounding tissues of the body.

Nevertheless, the cell cycle can also be a key factor in repairing the uncontrolled proliferation of cancer cells. The objective of this research project is to characterize the mechanism of action of two different antineoplastic drugs that intervene in the cell cycle: cisplatin and the CDK inhibitor RO-3306.

The methodology used consisted of preparing the different cell cultures with mouse breast neoplastic cells, adding the different drugs, letting the cells incubate for between 14 and 24 hours depending on the plate, and analyzing the results with flow cytometry and microscopy.

The results indicate that the cell cycle can be stopped at different points, depending on the drug administered. In vitro, the interruption of the cycle in the S phase caused by cisplatin appears to be more effective than the inhibition of the transition phase G<sub>1</sub> to M, induced by CDK inhibitor (RO-3306).

In conclusion, this study has shown that stopping a cell's cycle is an effective mechanism to prevent the progression of tumor growth.

## Resumen

El ciclo celular es el mecanismo esencial de todas las células para su proliferación y reparación. Si ocurre una mutación durante el ciclo celular, la célula hija heredará esta mutación. Este hecho puede conducir al desarrollo del cáncer, una enfermedad que provoca una proliferación celular descontrolada que potencialmente invade y destruye los tejidos circunstantes del organismo.

Sin embargo, el ciclo celular también puede ser un factor clave para curar el crecimiento descontrolado de las células cancerosas. El objetivo de este proyecto de investigación es caracterizar el mecanismo de acción de dos fármacos diferentes antineoplásicos que intervienen en el ciclo celular: Cisplatino y el inhibidor de CDK RO-3306.

La metodología utilizada ha consistido en preparar los diferentes cultivos celulares con células neoplásicas de mama de ratón, añadir los diferentes fármacos, dejar incubar las células entre 14 y 24 horas dependiendo de la placa y analizar los resultados con citometría de flujo y microscopía.

Los resultados del trabajo indican que el ciclo celular puede ser bloqueado en diferentes puntos, dependiendo del fármaco administrado. *In vitro*, la interrupción del ciclo en la fase S inducida por Cisplatino parece ser más efectiva que la inhibición de la transición fase G2 a M, inducida por el inhibidor de CDK (RO-3306).

En conclusión, en este trabajo se ha comprobado que detener el ciclo celular de las células es un mecanismo efectivo para evitar la progresión del crecimiento tumoral.

# ÍNDEX:

<b>Antecedents</b>	<b>7</b>
<b>Objectius i hipòtesi de treball</b>	<b>8</b>
<b>1. Introducció teòrica</b>	<b>9</b>
1.1 Les cèl·lules	9
1.1.1 La forma de les cèl·lules	10
1.1.2 La mida de les cèl·lules	11
1.1.3 La relació entre mida, forma i estat de la cèl·lula	12
1.1.4 Estructura de les cèl·lules	12
1.2 El càncer	14
1.2.1 Estadístiques del càncer	15
1.2.2 Causes de formació de càncer	16
1.2.2.1 Factors intrínsecs	16
1.2.2.2 Factors extrínsecs	16
1.2.3 Els gens del càncer	17
1.2.4 Estimuls i factors de creixement del càncer	18
1.2.5 Tipus de càncer	19
1.2.6 Fases formació del càncer	20
1.2.7 Tractaments estàndards	21
1.2.7.1 Cirurgia	21
1.2.7.2 Radioteràpia	21
1.2.7.3 Quimioteràpia	21
1.2.7.3.1 Teràpia amb Cisplatí	22
1.2.8 Teràpies innovadores	22
1.3 El cicle cel·lular	24
1.3.1 Interfase	24
1.3.1.1 Fase G1	25
1.3.1.2 Fase S	25

1.3.1.3 Fase G2	25
1.3.2 Divisió cel·lular	25
1.3.2.1 Mitosi	26
1.3.2.1.1 Profase	26
1.3.2.1.2 Metafase	26
1.3.2.1.3 Anafase	26
1.3.2.1.4 Telofase	26
1.3.2.1.5 Citocinesi	26
1.3.3 Punts de control del cicle cel·lular	27
1.3.4 Ciclines i CDKs	28
1.3.4.1 Expressió de les ciclines a les diferents fases	28
<b>2. Materials i mètodes</b>	<b>30</b>
2.1 Morfologia i característiques de les cèl·lules	31
2.1.1 Morfologia de les cèl·lules canceroses	32
2.2 Passatges cel·lulars	34
2.2.1 Càlculs	34
2.2.2 Protocol per l'obtenció de passatges cel·lulars	35
2.3 Tractament cèl·lules amb l'inhibidor RO-3306	38
2.3.1 Protocol per l'inhibidor RO-3306	38
2.4 Tractament cèl·lules amb teràpia amb Cisplatí	39
2.4.1 Procediment per la teràpia amb Cisplatí	39
2.5 Citometria de flux	40
2.5.1 Protocol	40
<b>3. Resultats</b>	<b>45</b>
3.1 Resultats de microscopia	45
3.2 Resultats de la citometria de flux	48
3.2.1 Tractament cèl·lules de 14 hores amb CDKi i cisplatin	49
3.2.2 Tractament cèl·lules de 24 hores amb CDKi i cisplatin	51
3.3 Cèl·lules mortes	52

<b>Conclusions</b>	<b>53</b>
<b>Bibliografia i webgrafia</b>	<b>54</b>

## Antecedents

La transformació d'una cèl·lula normal en una cancerosa és un fenomen fascinant. Existeix una àmplia varietat de càncers, cadascun amb singularitats importants. Tots ells, però comparteixen l'alteració del cicle cel·lular i, per aquest motiu, m'he proposat estudiar aquest cicle, la seva complexitat, els seus punts de regulació i com actuen els fàrmacs citostàtics sobre ell.

El treball de recerca que presento a continuació es centra en l'efecte causat per dos fàrmacs que actuen sobre el cicle cel·lular de les cèl·lules canceroses: un inhibidor de CDK (RO-3306) i la teràpia amb Cisplatí.

Aquest document consta de quatre parts:

La introducció teòrica, que conté els conceptes bàsics per poder entendre els materials, mètodes i resultats (conceptes com les fases del cicle cel·lular, el càncer, les cèl·lules, les CDKs i les ciclines); els materials i mètodes emprats per dur a terme la part pràctica, i que engloben tots els protocols i càlculs utilitzats al laboratori; els resultats obtinguts i, per últim, les conclusions extretes amb aquesta recerca.

Aquest treball s'ha realitzat a l'Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona, on m'han guiat i proporcionat els mitjans per a la part pràctica. Gràcies al suport dels investigadors d'aquest centre, s'ha tingut accés als fàrmacs, a cèl·lules canceroses i s'ha pogut analitzar els resultats amb citometria de flux.



## Objectius i hipòtesi de treball

L'objectiu principal d'aquest treball de recerca és caracteritzar el mecanisme d'acció del Cisplatí i dels inhibidors de CDK en el tractament del càncer.

La hipòtesi a la qual es pretén donar resposta és que aturar el cicle cel·lular de les cèl·lules canceroses, a través dels fàrmacs Cisplatí i inhibidors de CDK, pot ser un mecanisme efectiu per aturar el creixement de les cèl·lules tumorals.

Els objectius secundaris d'aquesta línia de recerca són:

1. Estudiar les diferències en el mecanisme d'acció dels fàrmacs emprats.
2. Ser conscient de la complexitat de treballar amb cultius cel·lulars, de l'esterilitat necessària i de la preparació amb anterioritat.

Altres objectius de recerca més generals:

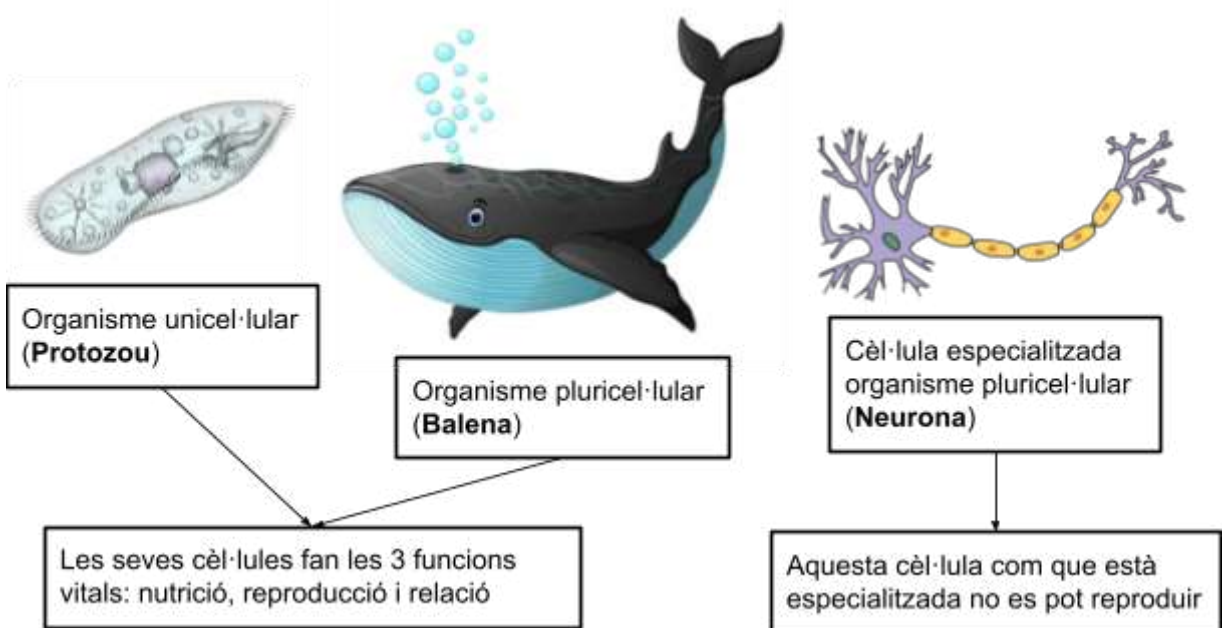
1. Conèixer més de prop la vida d'un investigador i com és la recerca biomèdica, en especial la formació i creixement de tumors.
2. Treballar i familiaritzar-se amb la metodologia i tècniques que existeixen actualment en els centres de recerca biomèdica.
3. Aprendre a treballar amb la precisió i meticulositat necessària perquè la investigació tingui èxit.

# 1. Introducció teòrica

## 1.1 Les cèl·lules

El terme “cèl·lula” va ser introduït per Robert Hooke l'any 1665. Les cèl·lules són estructures capaces de fer les tres funcions vitals: nutrició, reproducció i relació. Estan formades per: membrana plasmàtica, citoplasma i material genètic (ADN).

Les cèl·lules són les unitats bàsiques de la vida, vitals pel seu paper en l'herència de l'ADN. Hi ha organismes que estan formats per només una sola cèl·lula (organismes unicel·lulars), com llevats i bacteris. En canvi, molts altres éssers vius, com els arbres o els éssers humans, són organismes pluricel·lulars. En ambdós tipus, les cèl·lules duen a terme les tres funcions vitals comentades abans. Ara bé, en els organismes pluricel·lulars moltes de les seves cèl·lules s'especialitzen (com les neurones) i poden perdre la capacitat de reproduir-se.



**Figura 1:** Diferència de les funcions que duen a terme els éssers pluricel·lulars, unicel·lulars i cèl·lules especialitzades (Font: Pròpia).

Els éssers humans estan formats per aproximadament 37 trilions de cèl·lules especialitzades en diferents funcions i relacionades entre si per complexos sistemes de comunicació. Tot i aquesta enorme complexitat, totes elles provenen de la divisió cel·lular d'una única cèl·lula.

La teoria cel·lular va ser elaborada al segle XIX a partir dels postulats de Theodor Schwann i Matthias Schleiden. Aquesta teoria defineix tres principis sobre la cèl·lula:

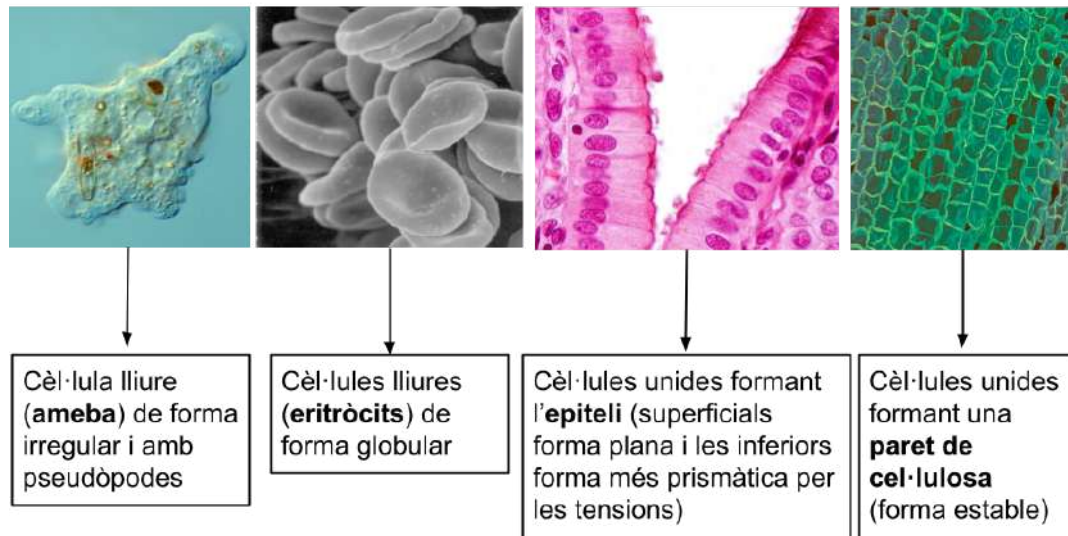
- La cèl·lula s'identifica com la unitat morfològica i fisiològica present en tots els éssers vius.
- La cèl·lula també s'identifica com la unitat genètica autònoma de tots éssers vius.
- Les cèl·lules únicament es poden originar a partir d'altres cèl·lules.

### 1.1.1 La forma de les cèl·lules

Les cèl·lules poden adoptar molts tipus de formes definides (el·líptiques, rodones, prismàtiques...) o no tenir una forma fixa:

- Les cèl·lules lliures (com els leucòcits fagocítics de la sang) tenen una membrana plasmàtica fàcilment deformable, fet que els permet canviar de forma constantment i emetre prolongacions citoplasmàtiques (pseudòpodes) per desplaçar-se i fagocitar partícules.
- Altres cèl·lules tenen forma globular, com els eritròcits o limfòcits sanguinis, a causa de la cohesió entre les molècules d'aigua.
- Moltes cèl·lules s'uneixen a altres formant teixits:
  - Cèl·lules sense parets cel·lulars rígides: la seva forma depèn de les tensions generades per les unions amb les cèl·lules contigües.
  - Cèl·lules amb parets cel·lulars rígides: presenten una morfologia molt estable.

En general, la forma de les cèl·lules es correlaciona amb la funció que exerceixen. Per exemple, les cèl·lules dels teixits musculars són allargades per permetre la contracció i relaxació del múscul, mentre que les cèl·lules del teixit nerviós són irregulars i amb prolongacions per poder transmetre els impulsos nerviosos.

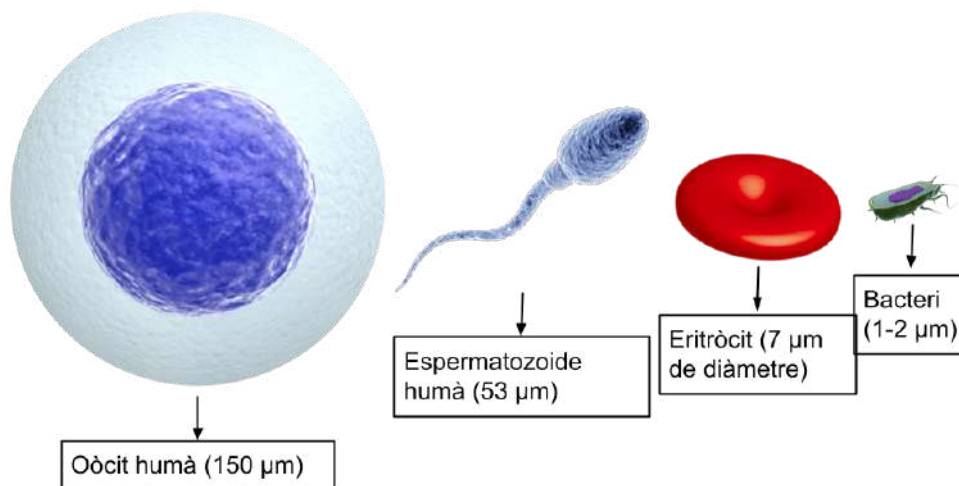


**Figura 2:** Diferents morfologies de les cèl·lules (Font: Pròpia).

### 1.1.2 La mida de les cèl·lules

La mida de les cèl·lules és molt variable i també s'associa a la seva funcionalitat. Per exemple, les cèl·lules reproductives, com és el cas dels espermatozoides i dels oòcits<sup>1</sup> en mamífers, són habitualment molt més grans que la resta.

Les cèl·lules amb més longitud són les neurones ja que, tot i que el seu cos cel·lular mesura desenes de micres, les seves prolongacions axonals poden assolir metres de longitud.



**Figura 3:** Escala de mides cel·lulars (Font: Pròpia).

<sup>1</sup> **Oòcit:** Cèl·lula sexual femenina que després de la divisió meiótica dona lloc a l'òvul. En les aus, els oòcits són el rovell de l'ou.

### 1.1.3 La relació entre mida, forma i estat de la cèl·lula

La capacitat de captar nutrients, d'alliberar substàncies de rebuig i la capacitat del nucli per dirigir les funcions cel·lulars, són els factors que condicionen la mida de les cèl·lules. Existeix una relació màxima entre volum i superfície a partir de la qual la cèl·lula deixa de ser eficient i ha de dividir-se forçosament. Aquest límit màxim s'assoleix més fàcilment en cèl·lules esfèriques que en cèl·lules amb altres formes no esfèriques.

En cèl·lules tridimensionals esfèriques, el volum augmenta proporcionalment al cub del radi ( $V = 4 \pi r^3 / 3$ ), mentre que la superfície només augmenta proporcionalment al quadrat del radi ( $S = 4 \pi r^2$ ). Com que augmenta molt més el volum que la superfície, aquestes cèl·lules s'han de dividir més freqüentment per poder continuar fent les seves funcions vitals amb normalitat. És per això que les formes esfèriques són més típiques de cèl·lules joves que madures.

L'augment de volum de la cèl·lula no va acompanyat d'un augment de volum del nucli. Com a conseqüència, el nucli d'una cèl·lula extremadament gran no pot controlar totes les reaccions metabòliques que tenen lloc al seu citoplasma. Com més petita sigui la relació entre el volum nucleolar i citoplasmàtic, més a prop està la cèl·lula de la divisió.

### 1.1.4 Estructura de les cèl·lules

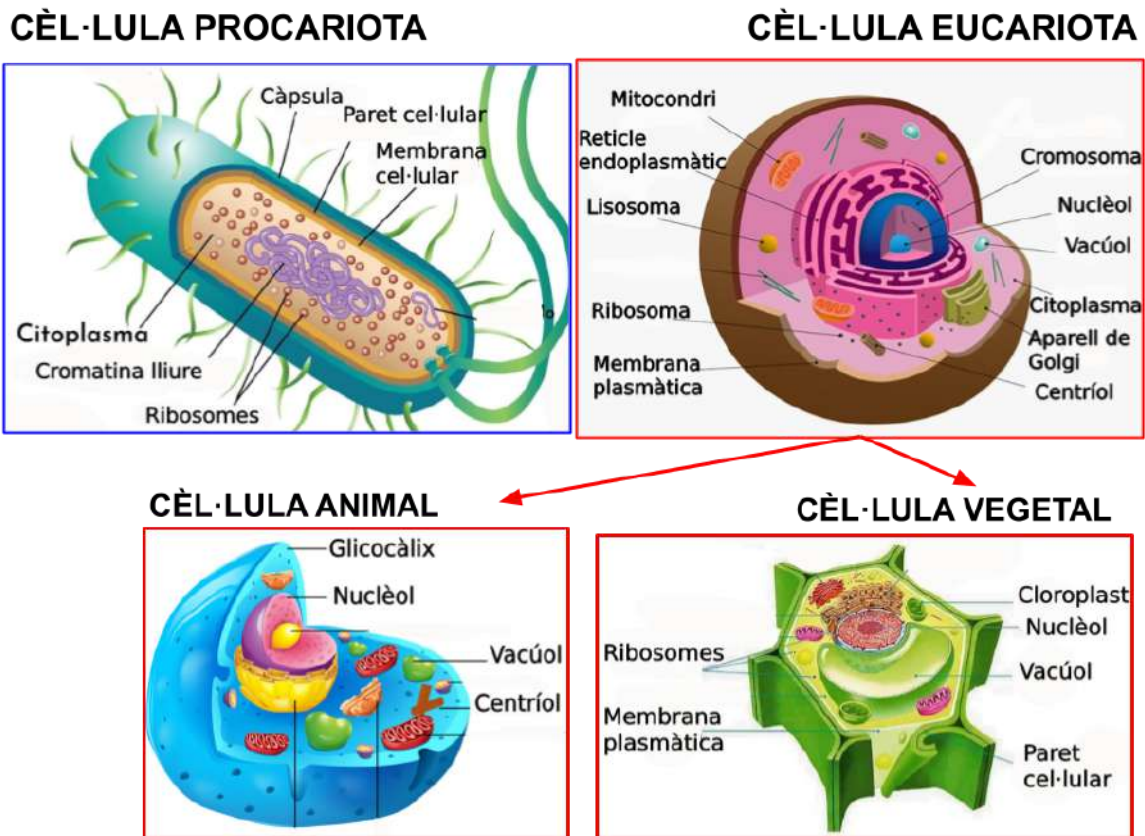
Les cèl·lules estan formades per tres estructures bàsiques:

- Membrana plasmàtica: Formada per una doble capa lipídica on hi ha adherides certes proteïnes que reconeixen substàncies de l'entorn de forma selectiva per permetre la seva entrada i sortida. Els lípids fan que la membrana actuï com una barrera aïllant entre el medi aquós intern i extern.
- Citoplasma: On hi ha el citosol, el medi intern líquid, i els orgànuls cel·lulars.
- Material genètic: Constituït per un o més filaments d'ADN.

La principal classificació cel·lular divideix les cèl·lules en dos grans grups:

- Cèl·lules procariotes: No tenen nucli, tenen el material genètic lliure al citoplasma.
- Cèl·lules eucariotes: Tenen membrana nuclear, és a dir, tenen nucli. Les cèl·lules eucariotes es divideixen en:

- Cèl·lules animals: Aquestes cèl·lules tenen una membrana de secreció anomenada glicocàlix que envolta la membrana plasmàtica i que està formada principalment per glúcids. Aquestes cèl·lules presenten centríols<sup>2</sup> i no tenen cloroplasts. Els seus vacúols són petits i dispersos pel citoplasma. Al centre de la cèl·lula hi ha el nucli.
- Cèl·lules vegetals: La seva membrana de secreció és la paret vegetal, formada principalment per cel·lulosa. No tenen centríols, però sí cloroplasts<sup>3</sup>. El nucli és lateral perquè presenten un gran vacúol central.



**Figura 4:** Esquema dels tipus de cèl·lules i les seves parts més característiques (Font: Pròpia).

<sup>2</sup> **Centríols:** Orgànul de forma cilíndrica. Crea el fus acromàtic i provoca la divisió equitativa dels cromosomes de les dues cèl·lules resultants de la divisió cel·lular.

<sup>3</sup> **Cloroplasts:** Orgànuls presents a les cèl·lules vegetals responsables del procés de la fotosíntesi.

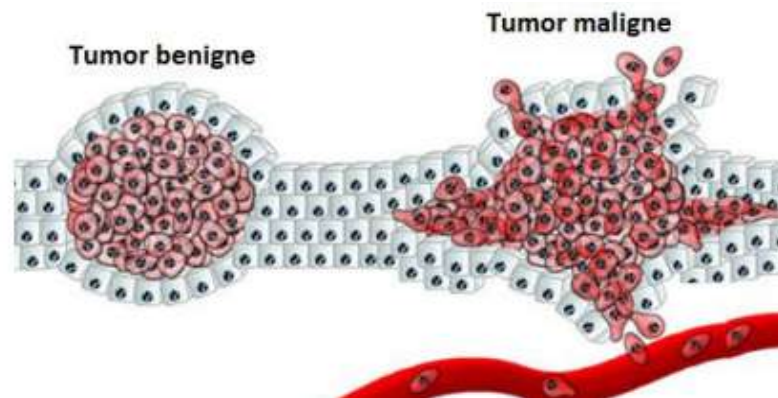
## 1.2 El càncer

El càncer és una malaltia que consisteix en la ràpida proliferació d'una part de les cèl·lules d'un teixit a causa d'una alteració genètica. El terme "càncer" es refereix a més de cent malalties o estats patològics, on les cèl·lules proliferen de manera descontrolada, envaint i destruint teixits circumstants. Aquestes cèl·lules formen tumors que poden desenvolupar metàstasi si es propaguen cap a altres teixits del cos a través del sistema circulatori o limfàtic.

Tot i la gran varietat de tipus de càncers descrits (cadascun amb les seves característiques i mètodes de tractament), tots ells comparteixen una mateixa característica: provenen d'una cèl·lula que ha patit una mutació irreparable en algun dels gens específics que controlen la divisió cel·lular. No només es necessita una mutació en la cèl·lula per desenvolupar càncer, sinó que normalment cal un nombre substancial d'accidents genètics i epigenètics rars perquè es formi. A més, aquesta malaltia no es sol diagnosticar fins molt temps després de l'exposició a l'agent causant o de la mutació (entre 5 i 20 anys).

Els tumors poden ser:

- **Benignes**: Si estan localitzats, no creixen indefinidament i no són invasors d'altres teixits o òrgans. Aquests tumors són fàcilment diferenciables dels malignes, ja que conserven certa semblança en la forma i propietats del teixit del qual provenen. No són cancerosos, però si s'observa un canvi de forma o color és recomanable extirpar-los. Un exemple de tumors benignes són les pigues o berrugues.
- **Malignes**: Les cèl·lules que formen aquesta pertorbació tenen capacitats destructives sobre l'organisme i estan relacionades amb l'aparició del càncer. Aquestes cèl·lules tenen capacitats invasores i poden envair altres teixits i òrgans del cos. Presenten una forma irregular per la seva proliferació descontrolada. En tumors malignes, com més desenvolupat estigui el seu creixement més evoluciona cap a estadis superiors i més probabilitat de metàstasi.

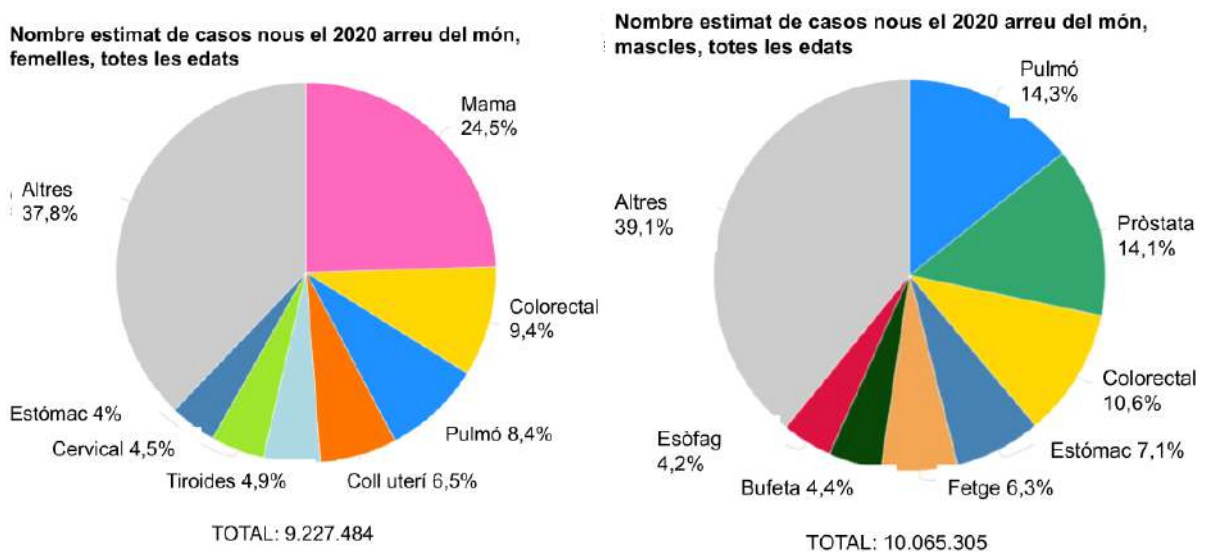


**Figura 5:** Diferència morfològia tumor benigne i maligne (Font: Research Gate).

### 1.2.1 Estadístiques del càncer

Segons les dades publicades el 2020 per l'Organització Mundial de la Salut, el càncer és la segona causa de mort després de les malalties cardiovasculars. A més, s'estima que al segle XXI el càncer esdevindrà la primera causa de mort en els països occidentals.

Entre el 30-50% de tots els casos diagnosticats amb càncer són evitables. Per aquest motiu, la taxa de supervivència entre pacients amb càncer ha anat augmentat en els últims anys gràcies a les campanyes de prevenció i conscienciació. A més, nous tractaments com la teràpia gènica, la immunoteràpia i la teràpia hormonal, també han contribuït a reduir la càrrega d'aquesta malaltia.



**Figura 6:** Gràfic del percentatge del tipus de càncer en dones (esquerra) i en homes (dreta) el 2020 (Font: UICC.org).



## 1.2.2 Causes de formació de càncer

Tot i que el càncer no té una causa concreta, sinó un conjunt de circumstàncies que afavoreixen la seva creació, s'ha comprovat que hi ha factors de risc que poden incrementar la probabilitat de contraure aquesta malaltia. En total hi ha més de 150 agents cancerosos que es poden dividir en dues categories:

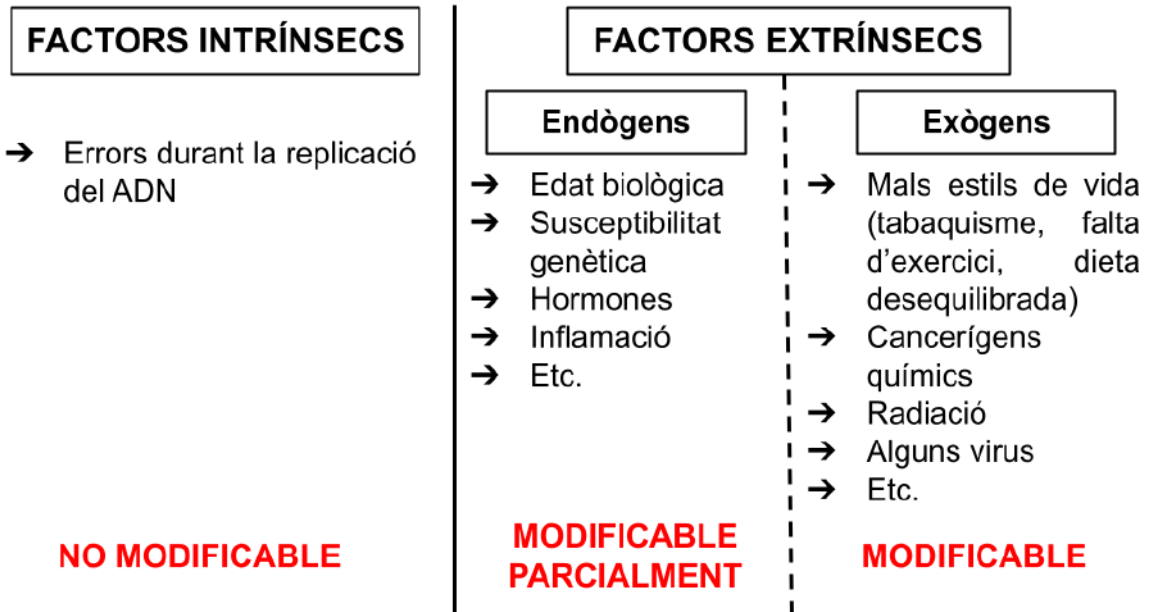
### 1.2.2.1 Factors intrínsecs

Són els factors de càncer que no poden ser modificables. Els factors intrínsecs són aquells que tots els humans tenim el mateix risc a patir i no depenen de l'organisme o dels seus hàbits i estil de vida. Un exemple d'element intrínsec són els errors que tenen lloc durant la replicació de l'ADN.

### 1.2.2.2 Factors extrínsecs

Són els factors cancerosos modificables, almenys parcialment. Com per exemple productes químics i virus. Aquests factors no intrínsecs es poden dividir en dues subcategories:

- Factors exògens: Són els factors ambientals externs (físics o químics), els hàbits, els estils de vida (dieta, exercici, alcohol, contaminació ambiental...) i algunes infeccions que afecten l'organisme. Generalment, inclouen hàbits que s'escullen i, per tant, poden ser evitats. Actualment, la gran majoria de càncers estan estretament relacionats amb l'estil de vida, comportament i hàbits que adopta la població. Alguns exemples de factors exògens són: fum de tabac per al càncer de pulmó, radiació UV per al càncer de pell i virus per al càncer de cèrvix i fetge.
- Factors endògens: Són factors biològics i genètics (edat biològica, susceptibilitat genètica, hormones o inflamació). L'estil de vida pot tenir també una certa incidència sobre aquests factors.

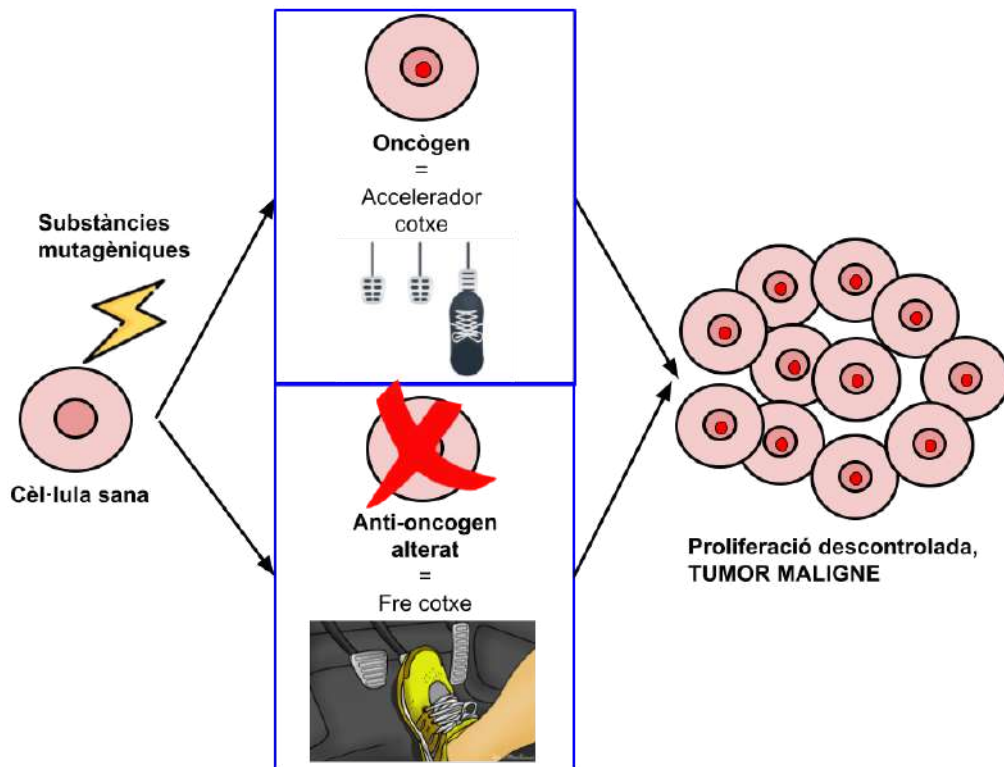


**Figura 7:** Esquema dels tres tipus de factors de risc del càncer (Font: Pròpia).

### 1.2.3 Els gens del càncer

Amb el pas dels anys i amb l'aparició de noves tècniques de diagnòstic, s'ha observat que la majoria de càncers diagnosticats són deguts a factors externs (especificats a l'apartat anterior) i que els que tenen caràcter genètic hereditari són una minoria. Els gens mutats en aquesta malaltia són:

- **Oncogens**: En una cèl·lula sana, aquests gens produeixen proteïnes que estimulen la proliferació cel·lular. Quan hi ha una mutació en aquests gens, es produeix una quantitat excessiva d'aquestes proteïnes. Sense el control dels factors de creixement, aquests gens es descontrolen i provoquen una proliferació excessiva i anòmala de la cèl·lula.
- **Antioncogens o gens supressors de tumors**: Una cèl·lula sana conté determinats gens que controlen el cicle cel·lular. Si es detecta algun error, aquests gens estan implicats en l'aturada del procés en uns punts concrets, induint la mort cel·lular programada, l'apoptosi. En una cèl·lula mutada, els senyals d'alerta que fan actuar els antioncogens s'inhibeixen i, per tant, no es produeix l'apoptosi tot i que la cèl·lula té alguna mutació en el seu ADN.

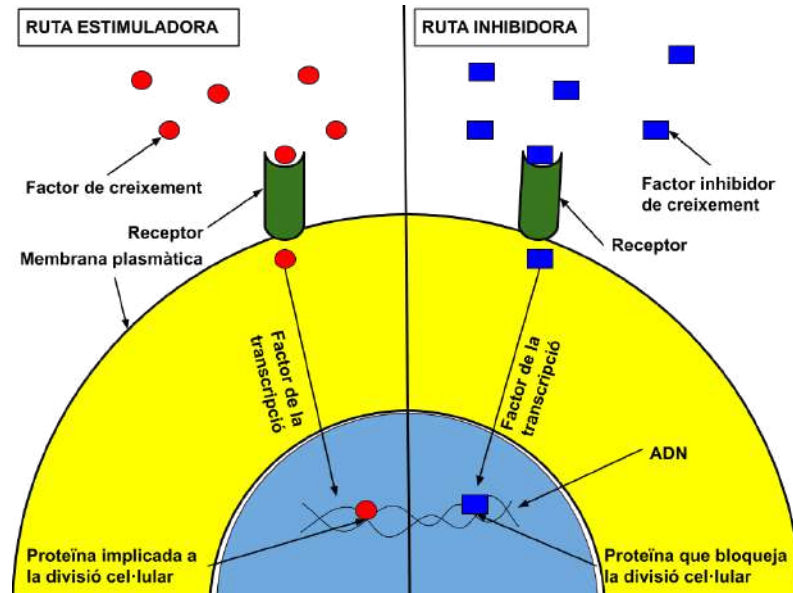


**Figura 8:** Alteració i promoció dels gens que provoquen un tumor maligne (Font: Pròpia).

#### 1.2.4 Estímuls i factors de creixement del càncer

A part dels gens que estimulen la proliferació cel·lular i l'alteració dels gens que aturen el cicle cel·lular, en la formació del càncer alguns tipus de substàncies químiques (com proteïnes externes a l'organisme) poden promoure el creixement cel·lular o inhibir-lo. Aquestes substàncies s'anomenen factors de creixement i el seu mecanisme d'acció consisteix en:

1. Unió amb certs receptors de la membrana plasmàtica de la cèl·lula: Els factors estimuladors o inhibidors del creixement cel·lular s'uneixen a uns receptors específics de la membrana plasmàtica i activen senyals i transmissors intracel·lulars.
2. Iniciar processos de transcripció dins del nucli: Quan els transmissors intracel·lulars són actius, s'introdueixen en el nucli de la cèl·lula i inicien processos de transcripció perquè es formi una nova proteïna que impulsarà o bloquejarà la divisió cel·lular.



**Figura 9:** Comparació ruta factors estimuladors i inhibidors del creixement tumoral (Font: Pròpia).

### 1.2.5 Tipus de càncer

En funció del teixit i del tipus cel·lular del qual deriven els càncers, es classifiquen en cinc grans grups:

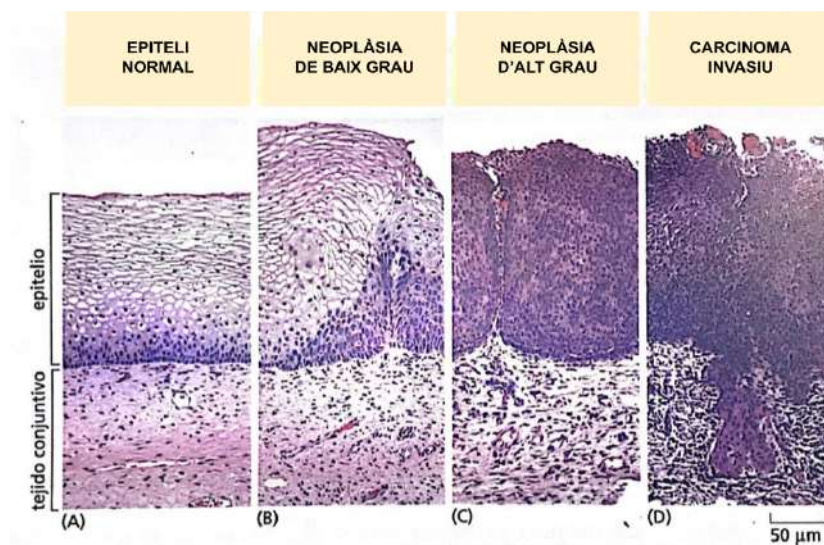
- **Carcinomes:** Deriven de les cèl·lules epitelials de la pell, òrgans interns buits o les glàndules. Són els càncers més freqüents en els éssers humans, ja que les cèl·lules epitelials estan més exposades a factors físics i químics i és la part del cos on hi ha més proliferació cel·lular. Solen ser el 80-90% dels casos totals de càncers. Exemples de carcinomes: càncer d'intestí, de mama, de còlon i de pulmons.
- **Sarcomes:** Deriven del teixit conjuntiu o cèl·lules muscular. També poden aparèixer en els ossos, cartílag o en el greix. Exemples: osteosarcoma (càncer dels ossos) i condrosarcoma (càncer de cartílag).
- **Mieloma:** S'originen a les cèl·lules plasmàtiques de la medul·la òssia. El mieloma és un tipus de càncer de la sang.
- **Leucèmies:** S'originen en les cèl·lules sanguínies, com els leucòcits. Quan apareix el càncer, la medul·la òssia comença a produir una gran quantitat de glòbuls blancs immadurs, que no són capaços de fer les seves funcions i l'organisme és propens a patir infeccions. Depèn del tipus de leucèmia també pot afectar el sistema nerviós.
- **Linfomes:** Afecten les cèl·lules i el sistema limfàtic. Els limfomes poden afectar a nòduls concrets situats a l'estómac, intestí, cervell, etc.

### 1.2.6 Fases formació del càncer

El càncer no apareix d'un dia per l'altre, comprèn una sèrie de fases i estadis des que es produeix un error en el material genètic d'una cèl·lula fins que es dissemina pels teixits i òrgans del cos. Aquest procés, anomenat carcinogènesi, consta de tres fases:

1. **Iniciació:** Es produeix una mutació o alteració en el material genètic en els gens encarregats de controlar la divisió cel·lular. Aquesta mutació pot ser ocasionada per agents mutagènics (radiacions o substàncies químiques) o pot tenir caràcter hereditari.
2. **Promoció:** Un cop s'ha produït la mutació la cèl·lula comença a proliferar i créixer de manera descontrolada perquè els mecanismes de control estan bloquejats.  
Un tumor no és visible amb tècniques d'imatge fins que la cèl·lula s'ha dividit 25-30 cops.
3. **Progressió:** En aquesta fase el tumor pateix un procés de vascularització anomenat angiogènesi. Aquest procés consisteix a la formació de nous vasos sanguinis amb la finalitat d'obtenir més oxigen i nutrients transportats per la sang i poder autoalimentar-se. En estar tan a prop dels nous vasos sanguinis també li és molt fàcil transportar cèl·lules malignes pel corrent sanguini i crear metàstasis en altres zones del cos.

En la majoria de casos, els tumors es solen propagar pel sistema limfàtic i un dels òrgans que més afecten són els ganglis. És per aquest motiu que la inflamació d'aquests pot ser un símptoma del càncer.



**Figura 10:** Estadis d'un tumor maligne (Font: *Biología Molecular de la célula*, Alberts et al., 2002).

## 1.2.7 Tractaments estàndards

Aquests tractaments són els més utilitzats avui en dia pel tractament del càncer. Triar un tractament o un altre depèn de molts factors (com la localització o grandària del tumor). A part, en molts càncers no només s'utilitza un d'aquests tractaments sinó que es combinen entre ells per tenir més eficàcia. Les principals eines terapèutiques emprades actualment per combatre el càncer són:

### 1.2.7.1 Cirurgia

La cirurgia pot ser utilitzada més d'una vegada pel diagnòstic i tractament del càncer. En alguns casos, per poder diagnosticar aquesta malaltia s'ha de fer una biòpsia<sup>4</sup>. Durant la cirurgia s'examinen els ganglis limfàtics i òrgans propers a la zona afectada, això permet saber quina quantitat de cèl·lules canceroses hi ha i com de lluny s'ha propagat.

També és habitual la cirurgia per extirpar el tumor o tumors, si es troba en una part molt localitzada del cos.

### 1.2.7.2 Radioteràpia

Utilitza partícules o ones d'alta energia per destruir les cèl·lules malignes, impedit que proliferin. La radiació malmet l'ADN de les cèl·lules. El seu inconvenient és que és un tractament local, només actua en una àrea concreta. Per aquest motiu, cal sotmetre al pacient a sessions molt agressives per eliminar el tumor per complet.

### 1.2.7.3 Quimioteràpia

És un dels tractaments més utilitzats i més eficaços per tractar el càncer. La quimioteràpia consisteix a l'administració de fàrmacs antineoplàstics, medicaments que actuen sobre les neoplàsies malignes de l'organisme. Aquests fàrmacs impedeixen que les cèl·lules tumorals creixin i formin metàstasis.

Els tumors poden ser:

- Quimiosensibles: si l'eficàcia del tractament supera el 50% dels casos (càncer de mama o pròstata).
- Quimioresistents: si l'eficàcia del tractament no supera el 50% (càncer de pàncrees o ronyó).

---

<sup>4</sup> **Biòpsia**: Extracció fragment teixit i sotmetre'l a estudi per saber si hi ha presència de cèl·lules tumorals i de quin tipus.

- Quimioterables: tots els càncers curables per quimioteràpia (limfoma de Hodgkin o carcinoma de testicle).

Tot i tenir molts beneficis en el tractament del càncer, els fàrmacs antineoplàstics són altament citotòxics i provoquen un gran nombre d'efectes secundaris. Per aquest motiu, no es poden administrar durant llargs períodes de temps i s'han de reduir el nombre d'administracions. Els principals inconvenients de la quimioteràpia són:

- Acció no selectiva i elevada toxicitat: Els fàrmacs antineoplàstics subministrats en la quimioteràpia no es limiten a la seva diana terapèutica, sinó que afecten a totes les cèl·lules de l'organisme per igual. En afectar les cèl·lules sanes també, sorgeixen efectes secundaris com: alopecia, vòmits...
- Resistència als agents quimioterapèutics: Les cèl·lules tumorals de l'organisme, mitjançant mecanismes genètics molt complexos, són capaces de crear resistència davant d'aquests fàrmacs i seguir proliferant.

S'ha comprovat que l'acció combinada de dos fàrmacs (teràpia combinada) és més efectiva que si només s'utilitza un sol tractament.

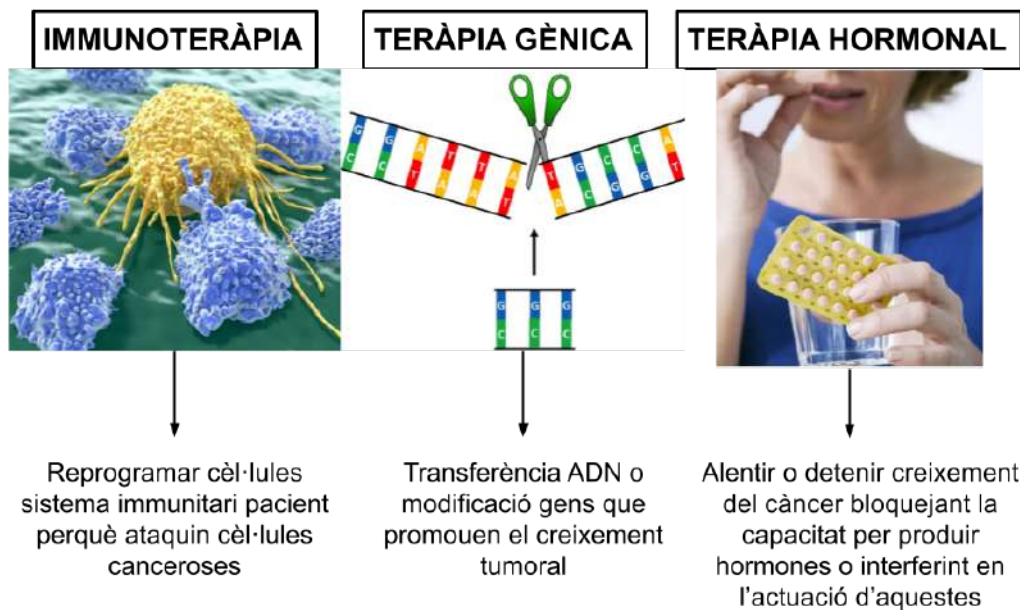
#### 1.2.7.3.1 Teràpia amb Cisplatí

El Cisplatí és un fàrmac que inhibeix la síntesi d'ADN, ARN i de proteïnes en les cèl·lules. Tots aquests compostos són essencials perquè la cèl·lula creixi i es divideixi. En evitar la divisió cel·lular, fa que aquest metall pesant sigui efectiu per tractar per determinats càncers (com el testicular, de mama, de cap o coll, etc.). Aquest medicament se subministra per infusió intravenosa i, com tots els tipus de tractaments quimioterapèutics, pot tenir efectes secundaris pel seu comportament citotòxic en l'organisme.

#### 1.2.8 Teràpies innovadores

Com s'ha vist en la secció anterior, els tractaments convencionals no sempre aturen la progressió de la malaltia, poden ser molt tòxics per les cèl·lules sanes del cos i poden crear resistència. Per això, avui en dia s'estan investigant i desenvolupant nous mètodes i teràpies que puguin ser menys agressius i que produeixin menys efectes secundaris. L'objectiu d'aquests nous tractaments contra el càncer, és ser menys invasius però més efectius i selectius. Alguns d'aquests tractaments són:

- **Immunoteràpia:** L'objectiu d'aquesta teràpia és utilitzar les cèl·lules del sistema immunitari del mateix pacient i reprogramar-les perquè ataquin les cèl·lules canceroses, ja sigui a partir de teràpia dirigida, virus oncolítics, modificació dels limfòcits o vacunes contra el càncer.
- **Teràpia gènica:** Aquesta teràpia consisteix en el tractament del càncer a partir de la transferència d'ADN o la modificació de gens que promouen el creixement tumoral.
- **Teràpia hormonal:** La teràpia hormonal, o també anomenada teràpia endocrina, es centra a alentir o detenir el creixement del càncer, bloquejant la capacitat del cos per produir hormones o interferint en l'actuació d'aquestes. Normalment, aquest tractament s'utilitza en càncers de pròstata o mama, els quals necessiten hormones per créixer.

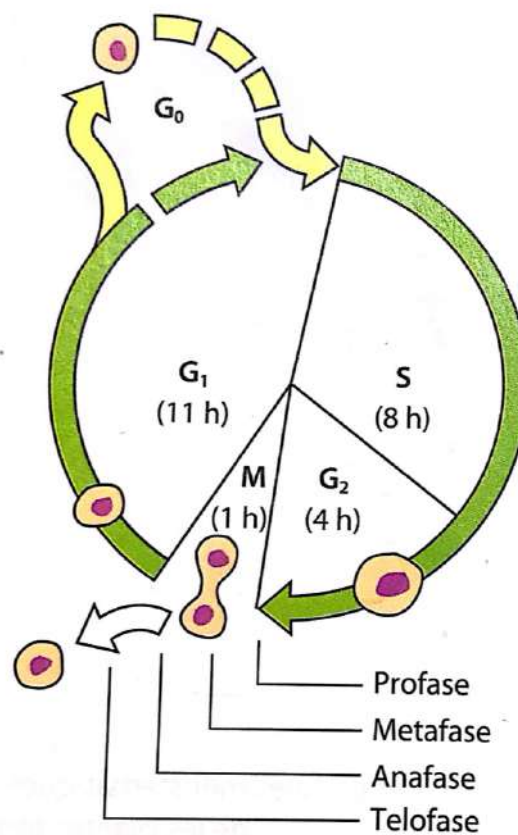


**Figura 11:** Esquema de tres tipus de teràpies innovadores contra el càncer i del seu mètode d'actuació (Font: Pròpia).



## 1.3 El cicle cel·lular

El cicle cel·lular és el període comprès des que es forma la cèl·lula fins a la seva divisió per generar noves cèl·lules idèntiques. En aquest cicle es poden diferenciar dues etapes en les cèl·lules eucariotes: la interfase i la divisió cel·lular. En un cicle cel·lular de 24 hores, la interfase tindrà lloc durant 23 hores aproximadament (11 hores fase  $G_1$ , 8 hores fase S i 4 hores fase  $G_2$ ) i la divisió cel·lular només l'hora restant.



**Figura 12:** Esquema fases cicle cel·lular (Font: Llibre Santillana Biologia 1r de Batxillerat).

### 1.3.1 Interfase

La interfase o fase de no-divisió té una llarga durada i la cèl·lula presenta un nucli que no canvia al llarg del procés (nucli interfàsic). Consta de tres subfases anomenades  $G_1$ , S i  $G_2$ .

### 1.3.1.1 Fase G<sub>1</sub>

En aquest interval es produeix una intensa activitat metabòlica, la cèl·lula augmenta de mida i genera nous orgànuls. També augmenta la síntesi d'àcids nucleics i de proteïnes necessàries per a la replicació. S'inicia la replicació dels centríols, però no es completarà fins al final de la mitosi. Al final d'aquesta fase hi ha el moment de no-retorn (en les cèl·lules dels mamífers s'anomena punt de restricció o punt R). Si les cèl·lules entren en aquest punt han de continuar amb el cicle cel·lular i dividir-se. Les cèl·lules que es diferencien per formar teixits (diferenciació cel·lular) no arriben al punt R perquè, abans d'arribar-hi, comencen a expressar alguns gens específics que les transformen en cèl·lules especialitzades. En aquests casos, les cèl·lules han entrat en el punt G<sub>0</sub>. Algunes cèl·lules molt especialitzades com les neurones, mai tornaran al cicle cel·lular i quedaran retingudes al punt G<sub>0</sub> i no es podran dividir mai. Altres cèl·lules poden tornar a la fase G<sub>1</sub> i assolir el punt R gràcies a l'acció de determinats activadors mitòtics, com hormones.

### 1.3.1.2 Fase S

Es produeix la duplicació de l'ADN. Continua la síntesi d'ARNm i de proteïnes, concretament d'histones<sup>5</sup>. Apareix en procentríol, un esbós de centríol, al costat de cada centríol.

### 1.3.1.3 Fase G<sub>2</sub>

S'inicia quan s'acaba la síntesi de l'ADN i finalitza quan es comencen a distingir els cromosomes. Continua la síntesi de proteïnes i factors essencials per la mitosi. Al final d'aquesta fase la cèl·lula conté dos diplosomes<sup>6</sup> madurs.

## 1.3.2 Divisió cel·lular

És una fase més curta on la cèl·lula presenta cromosomes. En aquesta etapa, a partir de la cèl·lula mare es formen dues filles amb idèntica dotació cromosòmica que la progenitora. La divisió cel·lular comprèn la divisió del nucli (mitosi o cariocinesi) i la divisió del citoplasma (citocinesi).

---

<sup>5</sup> **Histones:** Proteïnes que faciliten la compactació del material genètic agrupant la cromatina en nucleosomes.

<sup>6</sup> **Diplosoma:** Estructura que formen dos centríols quan s'agrupen de forma perpendicular.

### 1.3.2.1 Mitosi

Aquesta divisió té lloc per originar cèl·lules amb el mateix nombre de cromosomes que la progenitora.

Gràcies a la mitosi, les cèl·lules somàtiques dels éssers pluricel·lulars tenen la mateixa dotació cromosòmica que el zigot, la primera cèl·lula de l'organisme.

La mitosi consta de quatre fases: profase, metafase, anafase i telofase.

#### 1.3.2.1.1 Profase

El seu inici té lloc quan es comencen a observar els cromosomes, formats per les dues fibres de cromatina enrotllades sobre si mateixes (cromàtides) unides pel centròmer. En aquesta condensació, el nuclèol desapareix. A partir del material pericentriolar es formen microtúbuls que es disposen radialment i acaben formant el fus mitòtic, encarregat d'organitzar els cromosomes i les cromàtides. Cada procentríol s'allarga i acaba formant un nou centríol.

#### 1.3.2.1.2 Metafase

Per les tensions de les fibres cromosòmiques, les cèl·lules es col·loquen a la meitat del fus mitòtic, al centre de la cèl·lula, formant la placa equatorial.

#### 1.3.2.1.3 Anafase

S'inicia quan es separen les dues cromàtides germanes. Al final d'aquesta fase, els grups de cromosomes (cromàtides) arriben als dos pols del fus mitòtic.

#### 1.3.2.1.4 Telofase

Comença quan les dues dotacions cromosòmiques situades a cada pol s'han agrupat en dues masses. Es produeix la descondensació dels cromosomes en cromatina. La telofase acaba quan aquestes masses de cromatina queden envoltades per l'embolcall nuclear i es formen dos nuclis.

#### 1.3.2.1.5 Citocinesi

La citocinesi és la divisió del citoplasma i formació de dues cèl·lules filles.

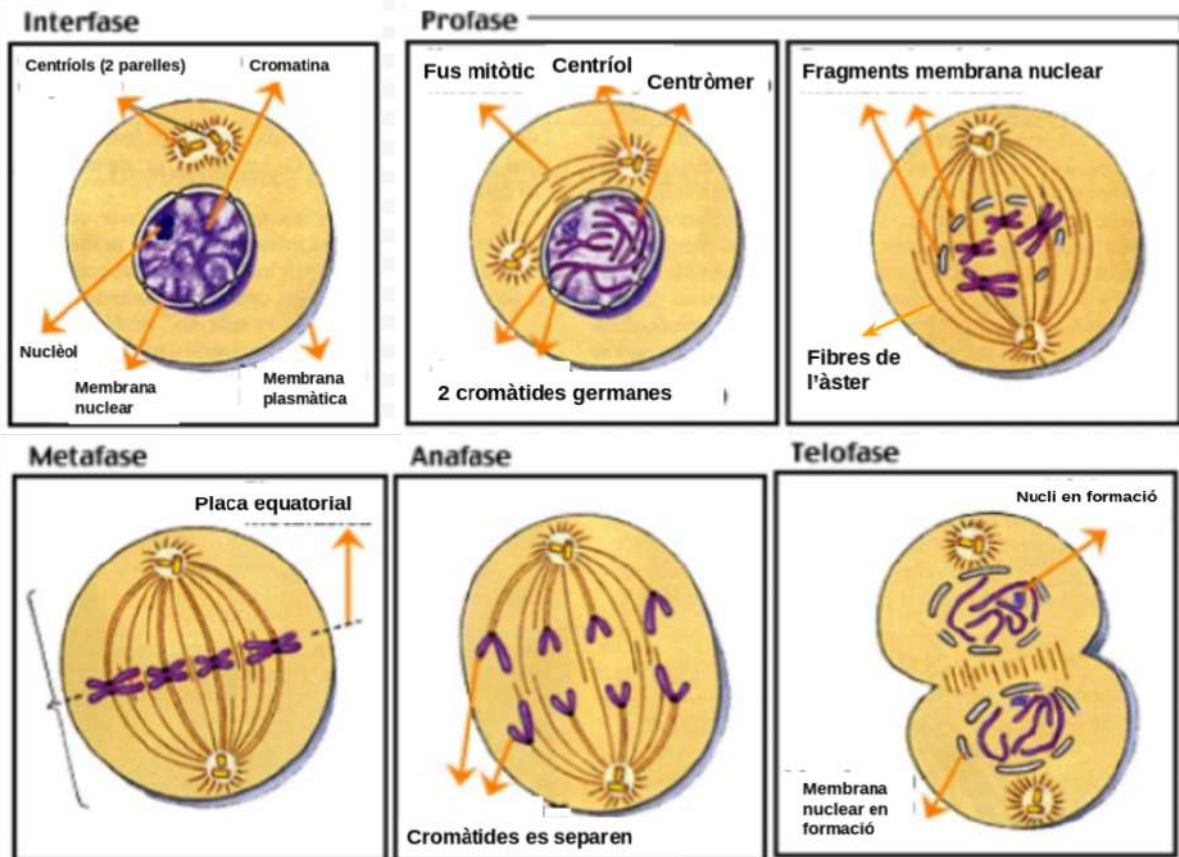


Figura 13: Etapes mitosi (Font: www.gtush.com).

### 1.3.3 Punts de control del cicle cel·lular

Per tal de garantir que el cicle cel·lular sigui completat correctament, hi ha mecanismes que verifiquen que cada fase hagi sigut completada amb precisió abans de continuar amb la següent. Hi ha dos punts de control principals:

- **Entre  $G_1$  i S:** Es comprova que l'ADN de la cèl·lula no s'hagi malmès. Si hi ha dany a l'ADN, s'atura el cicle i s'intenta reparar. Si el dany és impossible de reparar, s'activen les vies apoptòtiques que provoquen la mort a la cèl·lula.
- **Entre  $G_2$  i M:** S'analitza la terminació de la replicació de l'ADN i que aquest no s'hagi malmès durant la replicació. D'aquesta manera, s'assegura que la cèl·lula pot fer la mitosi amb seguretat.

### 1.3.4 Ciclines i CDKs

Per regular el cicle cel·lular són necessaris uns enzims anomenats ciclines. Les ciclines no tenen activitat enzimàtica si no s'uneixen a les CDK (cinases dependents de ciclines). Un cop unides, les ciclines activen les CDKs i aquestes són les encarregades de fosforilar certes proteïnes per portar a terme els diferents processos de les fases del cicle cel·lular.

Depenent de la fase del cicle cel·lular hi ha diferents ciclines i CDKs que s'uneixen. Quan la CDK ja s'ha unit a la ciclina i s'ha passat de fase, la CDK activa la degradació de la ciclina i, per consegüent, queda inactiva. D'aquesta manera, pot començar la següent fase del cicle cel·lular.

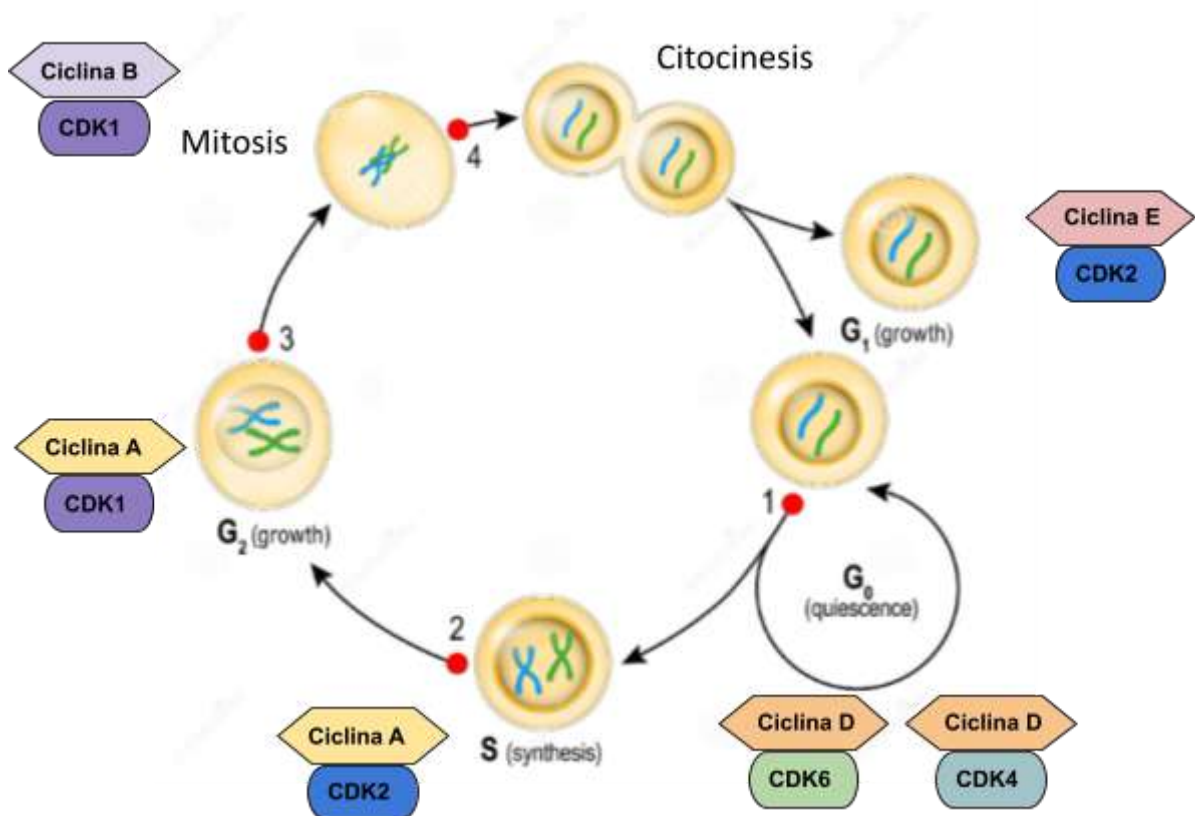
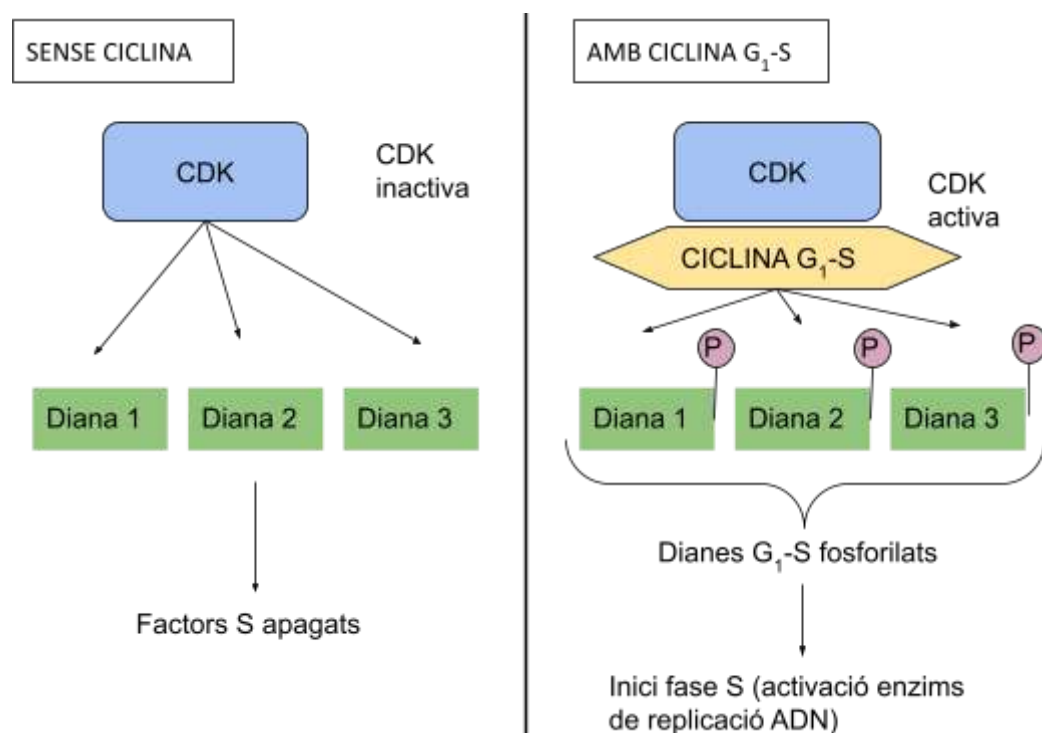


Figura 14: Fases cicle cel·lular (Font: Pròpia).

#### 1.3.4.1 Expressió de les ciclines a les diferents fases

A part d'activar les CDKs, les ciclines les dirigeixen a les proteïnes específiques necessàries per a la fase del cicle cel·lular. Per aquest motiu, les ciclines també són diferents en cada fase del cicle cel·lular. En total hi ha quatre ciclines:

- Ciclina A i B: S'uneixen a la CDK2 o CDK 1 i promouen la descomposició de l'embolcall nuclear i la condensació dels cromosomes entre d'altres. Actuen a la fase S, G<sub>2</sub> i Mitosi.
- Ciclina D: S'uneix a la CDK4 o CDK6 i permet que algunes cèl·lules que es torbaven en fase C<sub>0</sub> passin a fase S i també promou la duplicació de l'ADN. Participa en la fase G<sub>0</sub> i S.
- Ciclina E: S'uneixen a la CDK2 i impulsa que la cèl·lula passi el punt de restricció R i això provoca que la cèl·lula torni a començar el cicle cel·lular. Intervé a la fase G<sub>1</sub>.

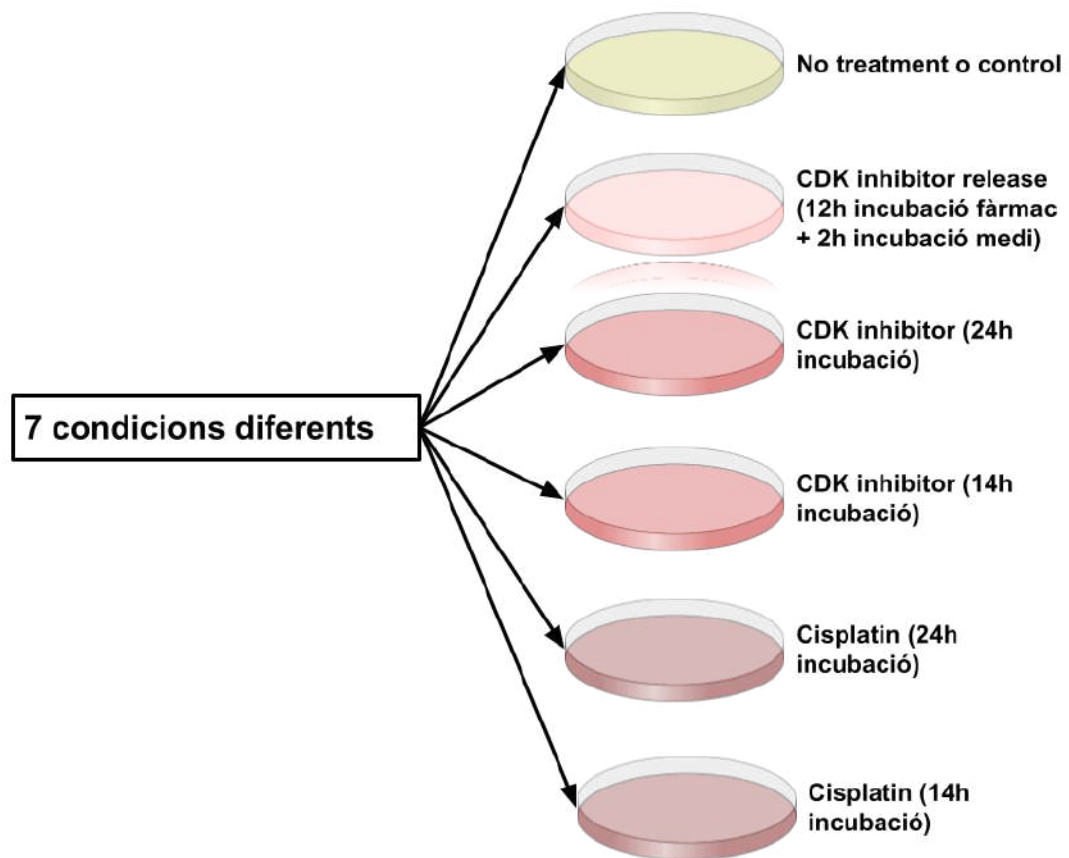


**Figura 15:** Actuació ciclina sobre el cicle cel·lular (Font: Pròpia).

Normalment, els nivells de CDK es mantenen estables al llarg del cicle, però la seva activitat i la de les proteïnes diana es veu incrementada quan puja la quantitat de ciclina, o disminuïda quan baixa. A més, també existeixen inhibidors de les CDK que s'uneixen a aquestes proteïnes o al complex CDK-ciclina i bloquegen la seva activitat.

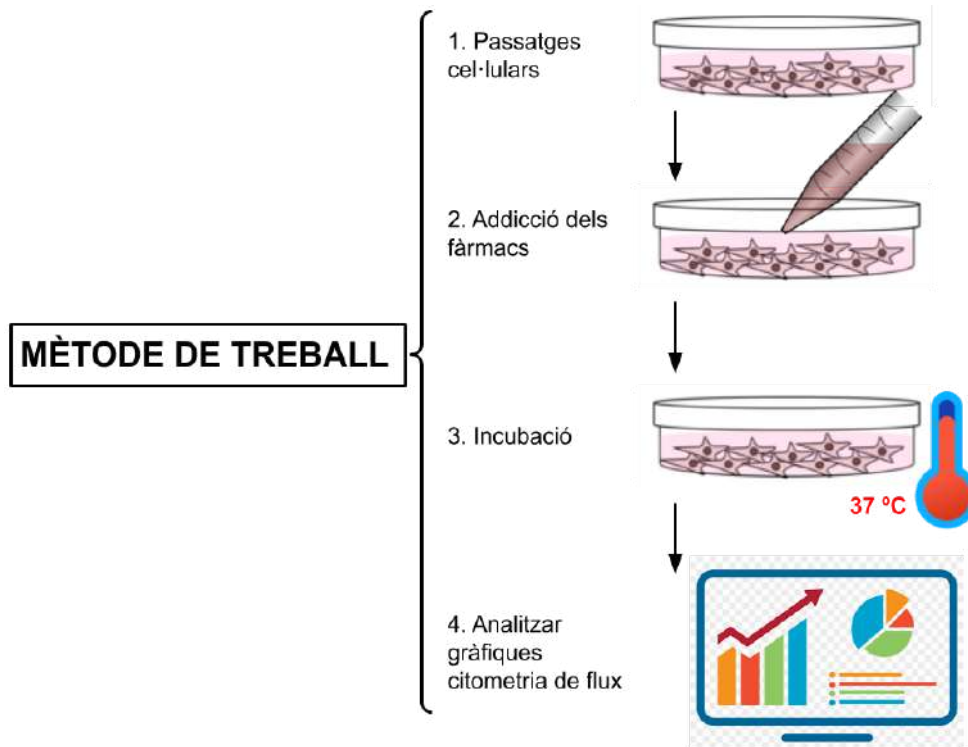
## 2. Materials i mètodes

S'ha estudiat l'acció dels dos fàrmacs antitumorals seleccionats (inhibidor de CDK i Cisplatí) sobre el cicle cel·lular de les cèl·lules de mama canceroses de ratolí. S'han preparat diferents plaques de cultiu cel·lular que han estat sotmeses a diferents intervencions: no treatment, CDK inhibitor (14 hores), Cisplatí (14 hores), CDK inhibitor (24 hores), Cisplatí (24 hores) i CDK inhibitor release.



**Figura 16:** Esquema dels fàrmacs afegits a cada placa de cultiu utilitzada per aquest experiment (Font: Pròpia).

El mètode de treball ha consistit a crear els diferents passatges cel·lulars (més informació a la secció 4.2), afegir els diferents fàrmacs a les plaques de cultiu cel·lular (deixant-ne 3 per ser grup control), incubar de les plaques seguint el temps de cada placa (especificats en la figura 16), comptar les cèl·lules que es troben en cada fase del cicle amb citometria de flux (explicació del seu funcionament a l'apartat 4.5) i analitzar els resultats i gràfiques.



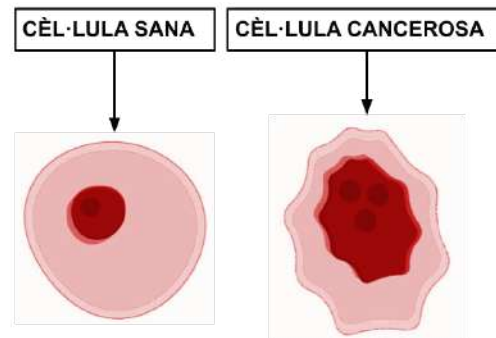
**Figura 17:** Diagrama protocol de la part pràctica a grans trets (Font: Pròpia).

## 2.1 Morfologia i característiques de les cèl·lules

Abans de tractar les cèl·lules, vam observar les diferències entre cèl·lules sanes i cèl·lules canceroses a través del microscopi. Això ens va permetre entendre els canvis de morfologia entre aquests dos tipus cel·lulars i les característiques principals de cadascuna:

- Cèl·lules sanes: Les cèl·lules sanes tenen formes més arrodonides i regulars. També es poden observar unions entre elles. Els nuclis no ressalten per la seva forma o color especialment. La cromatina està ben distribuïda dins del nucli.
- Cèl·lules canceroses: Aquestes cèl·lules tenen formes més irregulars i es poden observar canvis en el nucli: és més fosc, irregular, i ha augmentat de mida. Hi ha una reducció de les unions entre les cèl·lules, es disposen de forma més desorganitzada i hi ha moltes més cèl·lules en divisió. Hi ha cèl·lules que generen prolongacions per percebre el medi i fixar-se als teixits. La cromatina està agregada en diferents cúmuls dins del nucli.





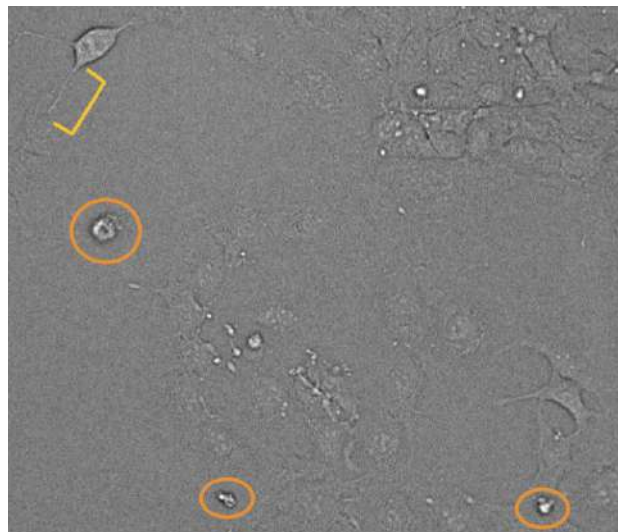
**Figura 18:** Comparativa histològica de cèl·lules normals i canceroses (Font: Pròpia).

### 2.1.1 Morfologia de les cèl·lules canceroses

Abans de tractar les cèl·lules canceroses, vam observar la seva morfologia i característiques en diferents etapes del cicle cel·lular amb un microscopi invertit de fluorescència. Les imatges presentades a continuació, tenen un augment de 20X:

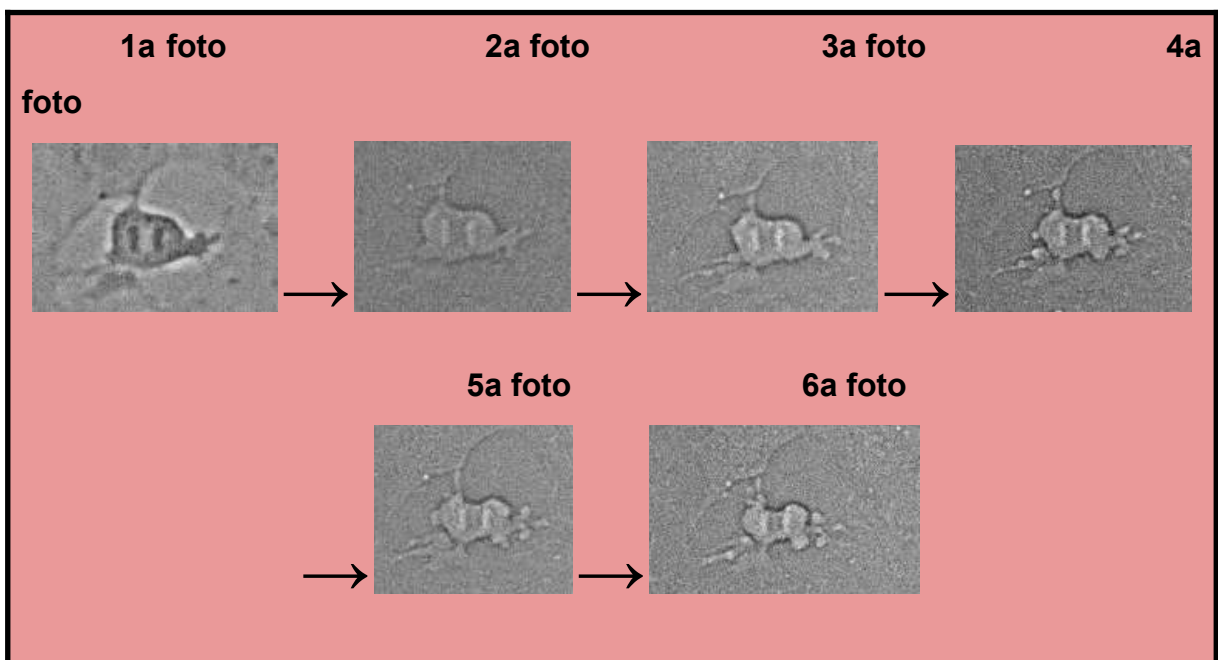
Indicat amb una marca **GROGA**, a la següent figura es pot observar la prolongació d'una cèl·lula. Com s'ha explicat anteriorment, alliberen aquests pseudòpodes per reconèixer l'entorn (per captar nutrients, trobar vasos sanguinis, enganxar-se a la placa de cultiu...).

Marcades amb un cercle **TARONJA**, hi ha tres cèl·lules que es troben en apoptosi, ja que presenten una mida més petita i apareixen petites protuberàncies a la seva membrana plasmàtica. A part, les cèl·lules en apoptosi es desenganxen de la placa de cultiu i això es pot apreciar en el color més blanc d'aquestes cèl·lules en el microscopi.



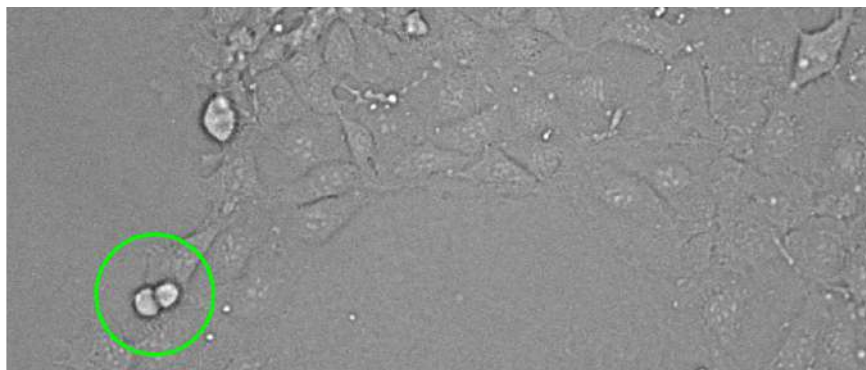
**Figura 19:** Imatge microscopi invertit de fluorescència (20X) (Font: Pròpia).

En la figura següent s'hi poden observar els diferents estadis d'una cèl·lula en fase de mitosi. En la primera imatge, es pot veure com la cèl·lula és més rodona, però ja es poden observar les dues fibres de cromatina en els dos pols. En la segona, la cèl·lula ja no és tan rodona i es pot veure l'inici de la creació de l'anell contràctil que dividirà la cèl·lula pel mig. Seguidament, a les fotos 3, 4, 5 i 6 s'observa la separació del que seran les dues cèl·lules quan es completi la citocinesi.



**Figura 20:** Fotografia microscopi invertit de fluorescència de cèl·lules en mitosi (20X) (Font: Pròpia).

A continuació, indicada amb un cercle **VERD** hi ha una cèl·lula que ha completat la citocinesi i, per tant, s'ha dividit.



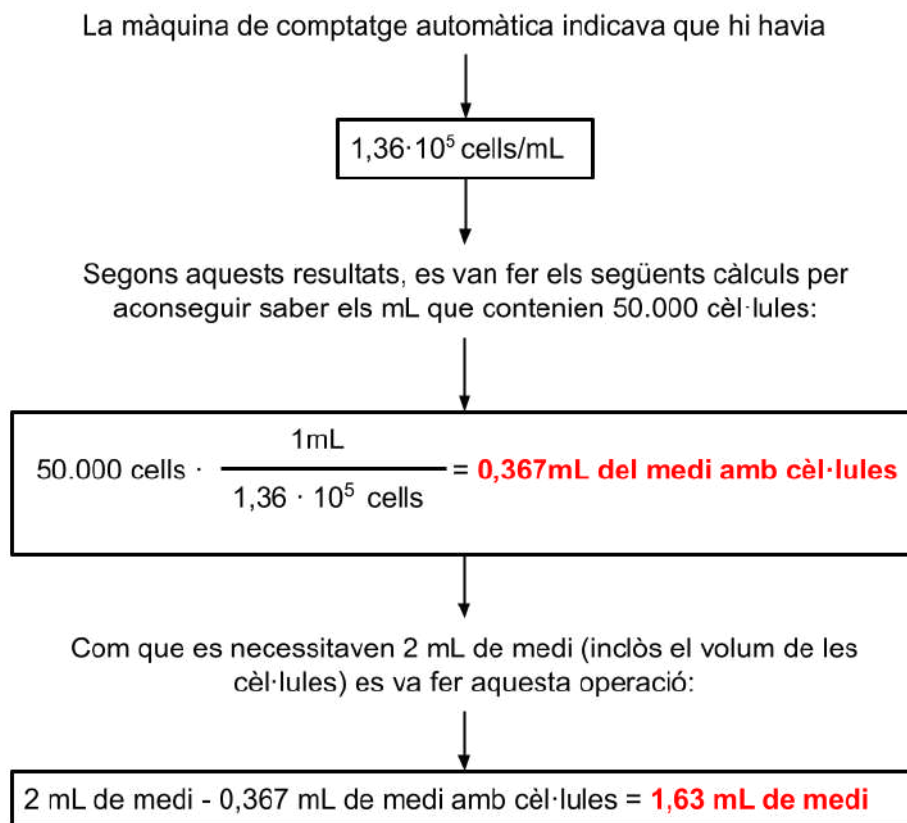
**Figura 21:** Fotografia microscopi invertit de fluorescència cèl·lules que han completat citocinesi (20X) (Font: Pròpia).

## 2.2 Passatges cel·lulars

Fer passatges cel·lulars consisteix a obtenir una placa de cultiu cel·lular amb sis pous amb la mateixa quantitat de cèl·lules i de medi cada pou, a partir d'un cultiu cel·lular amb un nombre indeterminat de cèl·lules canceroses.

### 2.2.1 Càlculs

Per dur a terme l'experiment, es necessiten 50.000 cèl·lules per cada placa de cultiu. Per aquest motiu, es van realitzar el procediment i els càlculs necessaris per saber la quantitat de mL que s'havien d'agafar del medi ric en cèl·lules canceroses per aconseguir la quantitat desitjada en cada placa.

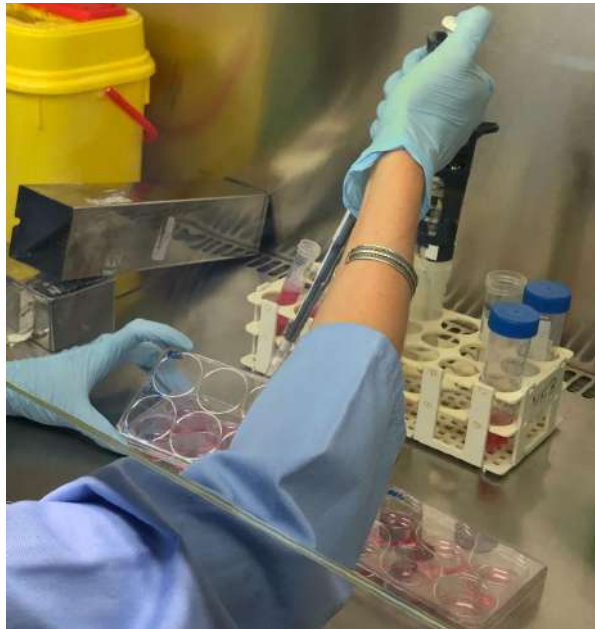


**Figura 22:** Esquema dels càlculs de la quantitat de cèl·lules per cada pouet de la placa de cultiu (Font: Pròpia).

Així doncs, el resultat dels càlculs va determinar que s'havien de posar 1,63 mL de medi sense cèl·lules i 0,367 mL de medi amb cèl·lules a cada pouet de cada placa de cultius.

### 2.2.2 Protocol per l'obtenció de passatges cel·lulars

1. Agafar el cultiu cel·lular de cèl·lules de mama de ratolí canceroses i aspirar tot el medi, deixant només les cèl·lules enganxades a la placa.
2. Afegir 10 mL de PBS<sup>7</sup> per fer un rentat a les cèl·lules. Un cop rentades, absorbir tot el PBS.
3. Afegir 1 mL de tripsina a la placa amb cèl·lules i posar a l'incubador a 37° durant 5 minuts. La tripsina és un enzim que descompon les proteïnes que permeten adherir les cèl·lules a la placa de cultiu i fa que es desenganxin.

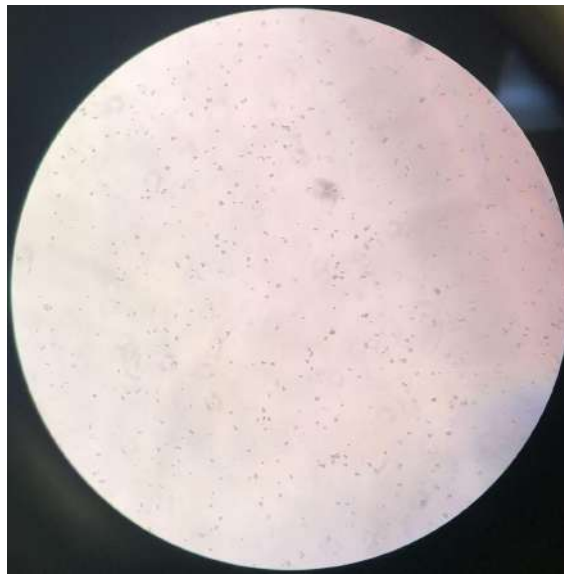


**Figura 23:** Addició d'1mL de tripsina a cada pouet de les plaques de cultiu (Font: Pròpia).

4. Comprovar al microscopi que la tripsina ha fet efecte, i que les cèl·lules s'han desenganxat. Això es pot saber movent la placa i observar el moviment del conjunt de cèl·lules.

---

<sup>7</sup> **PBS:** És una solució aquosa que manté constant el pH i la concentració d'ions de les cèl·lules perquè puguin desenvolupar-se en una placa de cultiu en les mateixes condicions que a dins de l'organisme.



**Figura 24:** Imatge microscopi de les cèl·lules tripsinitzades de cada pouet (Font: Pròpia).

5. Afegir 9mL de medi que s'ha de barrejar amb la mateixa pipeta per acabar de desenganxar i separar les cèl·lules.
6. Agafar la preparació de cèl·lules amb medi i posar-ho en un tub Falcon de 15 mL.



**Figura 25:** Pipetejant la preparació de cèl·lules i transferint-la a un tub Falcon de 15 mL (Font: Pròpia).

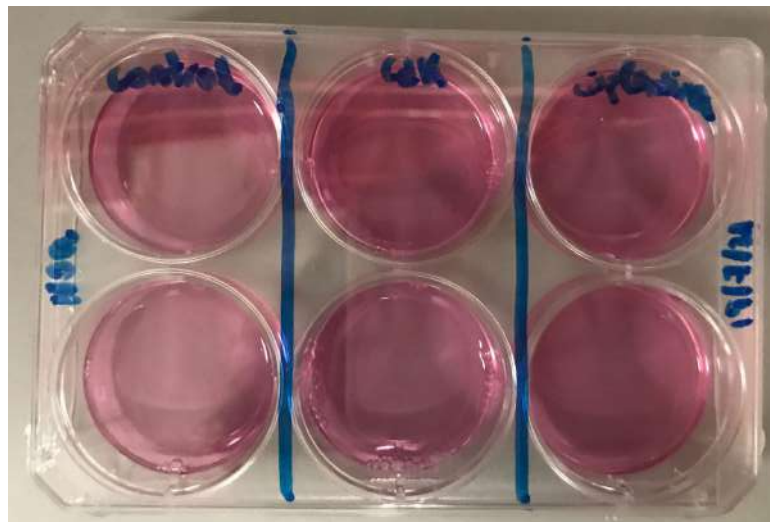
7. Barrejar el contingut del tub i agafar 10  $\mu$ L de mostra.
8. Dipositar el contingut en una placa específica per contar cèl·lules a través d'un comptador automàtic de cèl·lules.

9. Posar la placa específica dins de la màquina de comptatge.



**Figura 26:** Placa i màquina de comptatge utilitzades (Font: Biorad.com).

10. Calcular quants mL calen per agafar 50.000 cèl·lules a partir del valor de cèl·lules per mL obtingut a través de la màquina de comptatge.
11. Agafar la quantitat de dissolució amb cèl·lules calculada i posar-lo a cada pouet de la placa de cultius.
12. Afegir medi fins a tenir 2 mL a cada pouet.
13. Deixar incubar a 37° durant 2 dies.



**Figura 27:** Passatge cel·lular utilitzat en aquest experiment (Font: Pròpia).

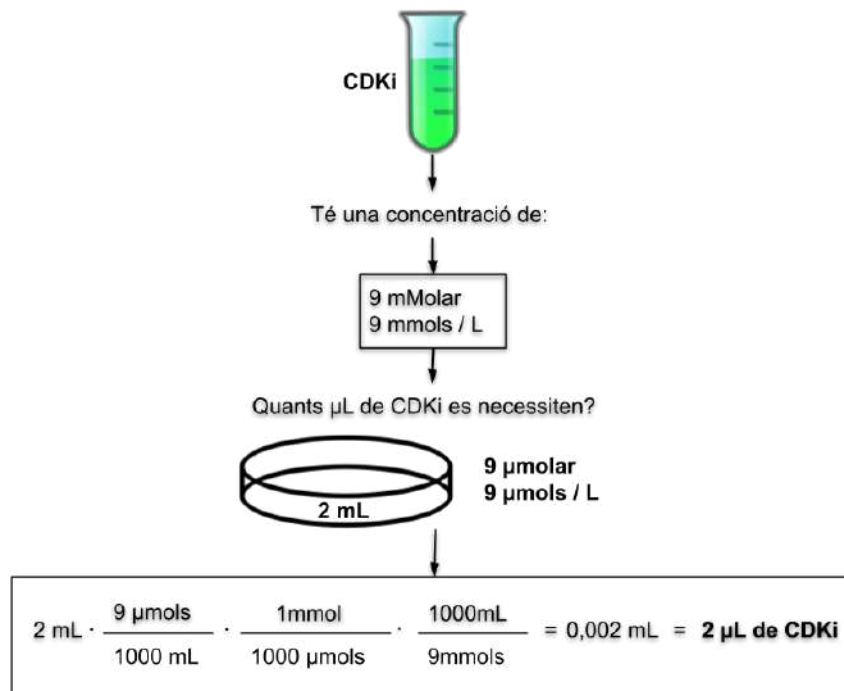
## 2.3 Tractament cèl·lules amb l'inhibidor RO-3306

Els inhibidors de CDK poden actuar de diverses maneres: poden bloquejar l'accés al substrat, canviar estructuralment lloc actiu de la CDK, bloqueig de la interacció amb la ciclina, etc.

L'inhibidor de CDK utilitzat en aquesta pràctica (RO-3306) atura el cicle cel·lular mitjançant la inhibició de l'activitat enzimàtica de CDK1 i de CDK2. Com que inhibeix més efectivament CDK1, en aquest treball ens centrarem en la inhibició que provoca en aquest enzim, per tant, de la inhibició que provoca per passar de fase G<sub>2</sub> a M.

### 2.3.1 Protocol per l'inhibidor RO-3306

Per dipositar la quantitat adequada d'inhibidor de CDK a cada pouet de la placa de cultius, es van haver de fer els següents càlculs:



**Figura 28:** Esquema dels càlculs de la quantitat de CDKi per a cada pouet (Font: Pròpia).

Després de fer els càlculs, es va comprovar que s'havia de dipositar 2 µL d'inhibidor de CDK als pouets de les plaques que s'havien de tractar amb inhibidors de CDK.

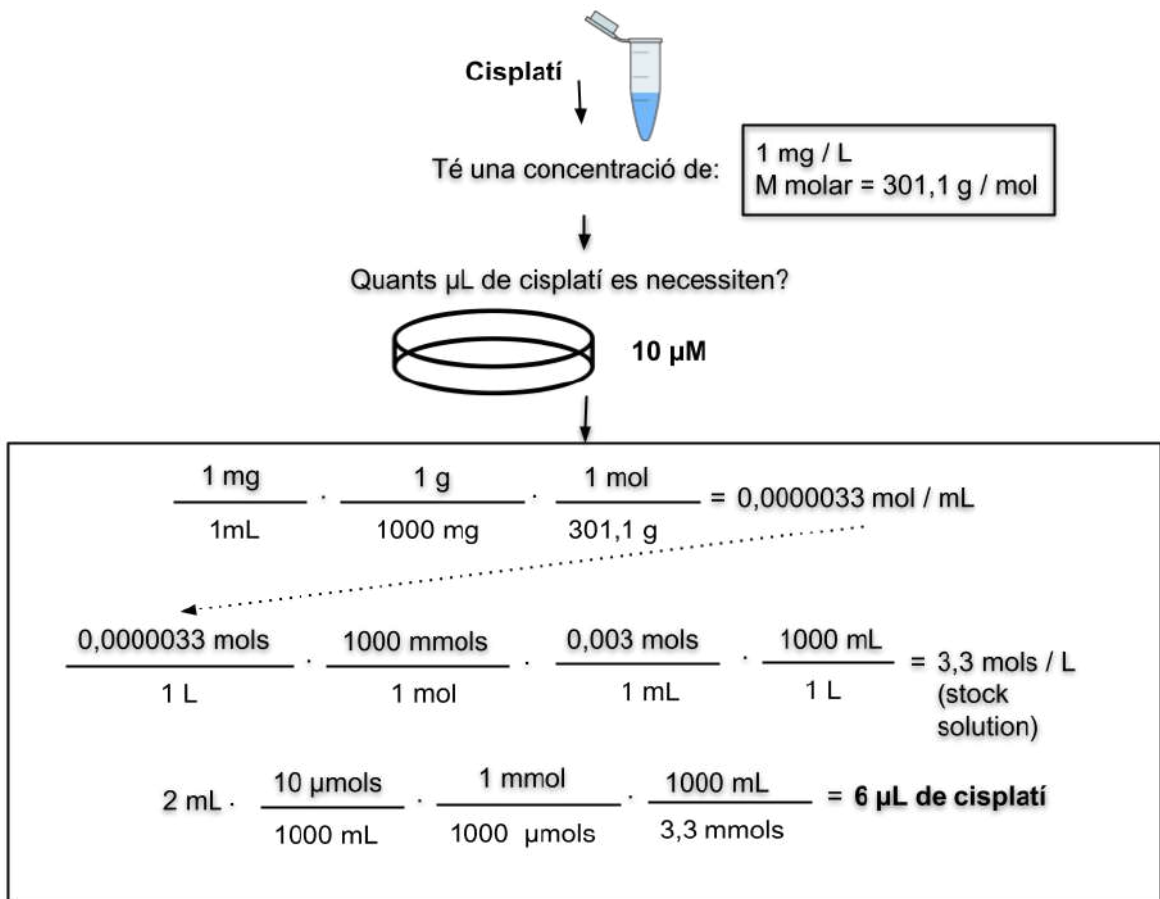
## 2.4 Tractament cèl·lules amb teràpia amb Cisplatí

El Cisplatí és un fàrmac que inhibeix la síntesi d'ADN produint enllaços creuats a dins de les cadenes d'ADN. En menor grau, també inhibeix la síntesi de proteïnes i d'ARNm. Normalment, el Cisplatí s'utilitza conjuntament amb altres tractaments pels següents càncers: ovàric metastàtic o avançat, carcinoma cervical, de pulmó, de cap i coll, etc.

Els efectes del Cisplatí a les cèl·lules en cultiu s'estudiaran de nou amb citometria de flux.

### 2.4.1 Procediment per la teràpia amb Cisplatí

Per saber quina quantitat de Cisplatí s'ha d'afegir als pouets, es van realitzar els següents càlculs:



**Figura 29:** Esquema dels càlculs de la quantitat de Cisplatí per a cada pouet (Font: Pròpia).

Per tant, es van haver de dipositar 6 µL de Cisplatí als pouets de cada placa.



## 2.5 Citometria de flux

La citometria de flux és una tècnica molt potent que permet determinar diversos paràmetres de les cèl·lules. La llum produïda pels làsers en un citòmetre de flux és dispersa per les cèl·lules de la mostra, mesurades per detectors, i després traduïdes a senyals que es poden analitzar i mesurar. Aquesta màquina es pot utilitzar per a diagnosticar el càncer, per saber certes característiques de les cèl·lules com la mida o la forma.

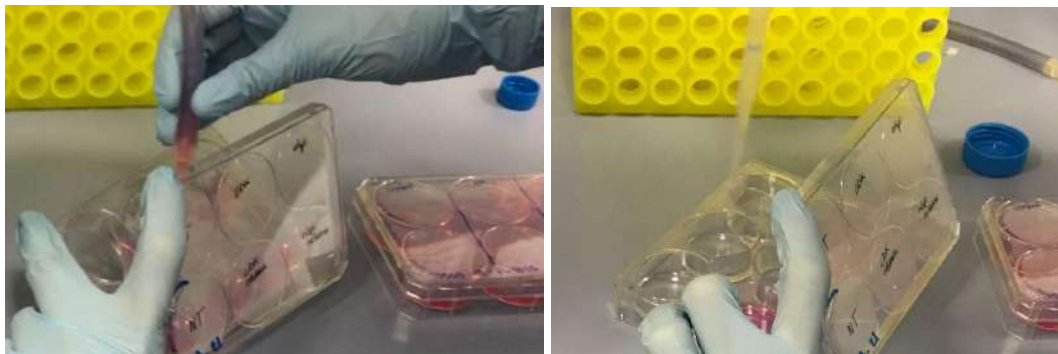
En aquest treball, s'ha analitzat amb aquesta tècnica la mida, la quantitat i en quina fase del cicle cel·lular es troben les cèl·lules canceroses. S'han analitzat els mateixos paràmetres per tots els diferents pouets de les plaques de cultiu per veure les diferències en el cicle de les cèl·lules canceroses tractades amb algun fàrmac antineoplàstic (inhibidor de CDK o Cisplatí) i les cèl·lules no tractades.

### 2.5.1 Protocol

Aquest mètode de tinció d'ADN utilitza etanol per fixar les cèl·lules i permeabilitzar la seva membrana. Això permet l'entrada de iodur de propidi (IP) a les cèl·lules. L'IP s'intercala a la doble hèlix de l'ADN i segons la fase del cicle cel·lular en la qual es troba la cèl·lula emet més o menys fluorescència.

En aquest procediment és important mantenir el nombre de cèl·lules en proporció amb la quantitat de iodur de propidi i evitar la variabilitat de concentració de cèl·lules. D'aquesta manera es pot observar la diferent intensitat de fluorescència de les mostres, sigui perquè les cèl·lules són diferents o per la presència de cèl·lules diploides (en fase  $G_2$  o mitosi).

1. Aspirar medi i netejar cèl·lules dues vegades amb PBS.



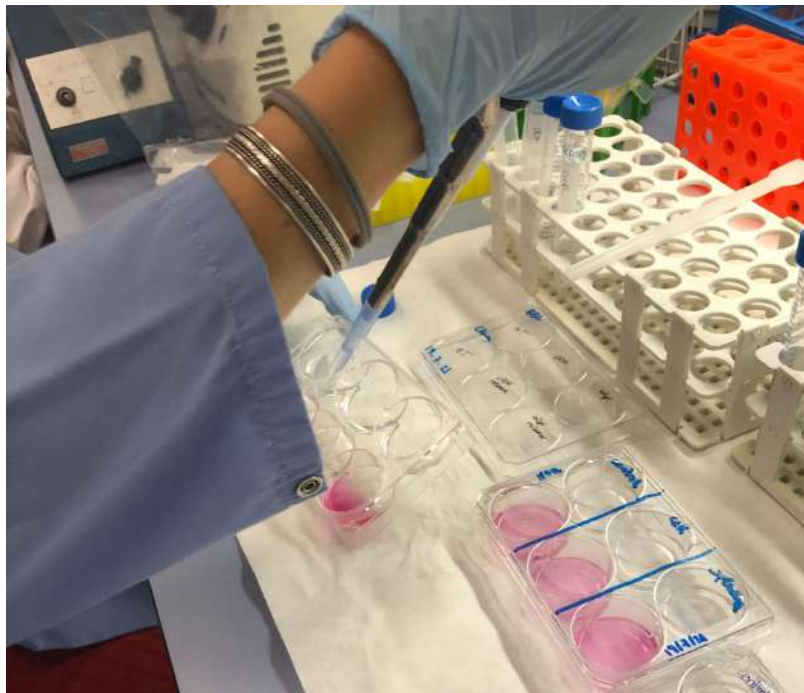
**Figura 30:** Imatges aspiració i addició de PBS (Font: Pròpia).

2. Utilitzant un *scraper*, una eina per rascar el fons de la placa de cultiu i desenganxar les cèl·lules d'aquesta.



**Figura 31:** Manipulació del scraper en els diferents pouets de les plaques de cultiu (Font: Pròpia).

3. Posar el PBS amb les cèl·lules en un tub de Falcon de 15 mL.



**Figura 32:** Transferir cèl·lules i PBS en un tub de Falcon de 15 mL (Font: Pròpia).

4. Centrifugar a 1200 rpm / 5 min.



**Figura 33:** Imatge de la centrifugadora emprada (Font: Pròpia).

5. Aspirar el PBS de les cèl·lules.



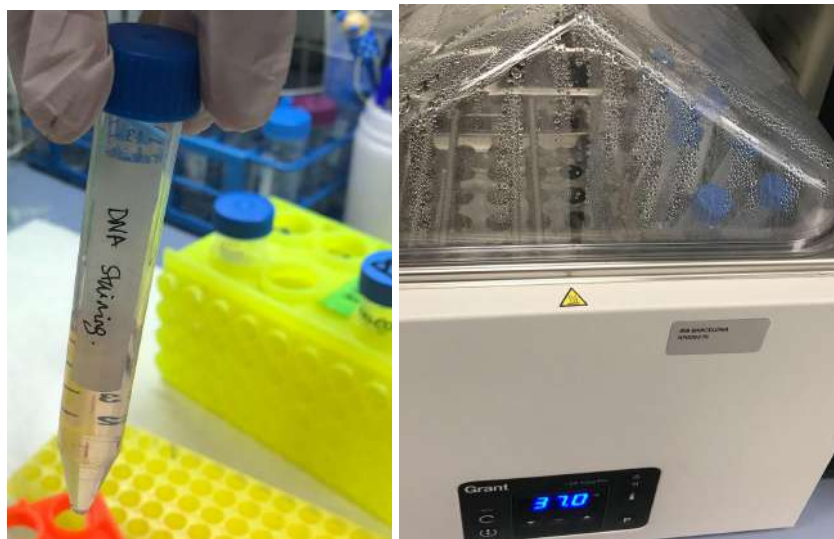
**Figura 34:** Aspirant el PBS de les mostres, ja que les cèl·lules havien precipitat (Font: Pròpia).

6. Afegir lentament 4 ml d'etanol 70% fred com el gel metre el tub amb les cèl·lules s'està barrejant amb el vòrtex.



**Figura 35:** Addició d'etanol mentre les cèl·lules es barregen amb el vòrtex (Font: Pròpia).

7. Deixar aquesta preparació al congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  durant 30 minuts.
8. Centrifugar a 1200 rpm / 5 min per remoure l'etanol i absorbir-lo.
9. Afegir 4 ml de PBS, centrifugar a 1200 rpm / 5 minuts i absorbir-lo.
10. Resuspendre la solució de tinció d'ADN (500 $\mu\text{l}$  de PBS, 5 $\mu\text{l}$  d'ARNasa 20mg / ml i 10 $\mu\text{l}$  IP 1mg / ml) i incubar 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 36:** Imatge de la solució de tinció d'ADN (DNA staining) i de la incubadora (Font: Pròpia).

11. Posar les preparacions al citòmetre. Aquest ha de tenir els següents paràmetres: mida contra dispersió (FSC / SSC) i només contar les cèl·lules individuals.



**Figura 37:** Imatge de les preparacions que posteriorment seran analitzades pel citòmetre (Font: Pròpia).



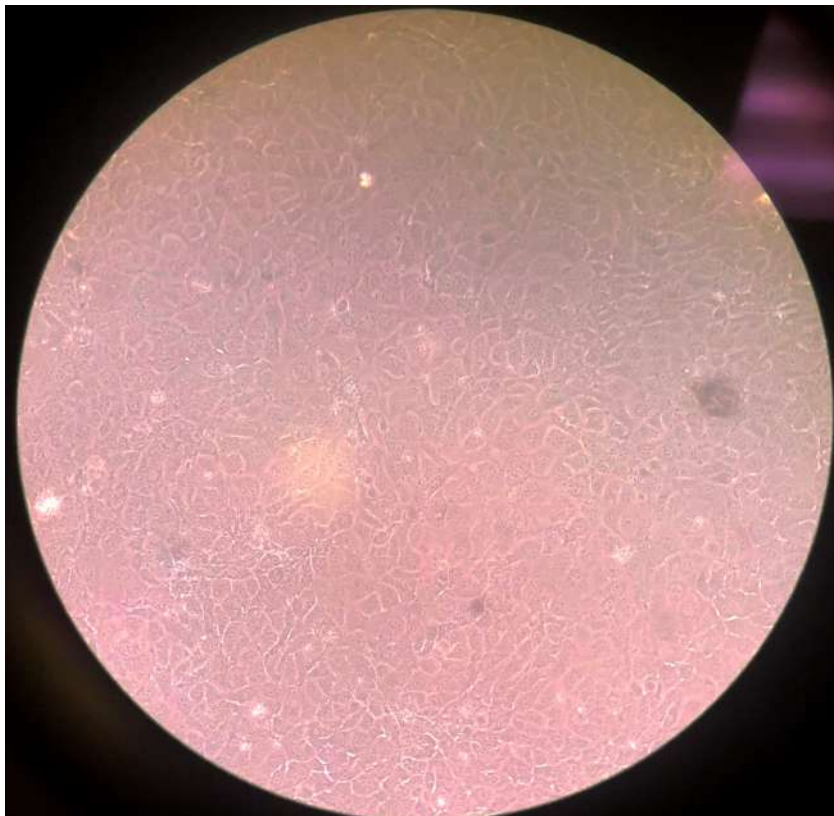
**Figura 38:** Imatge del citòmetre utilitzat (Font: Pròpia).

## 3. Resultats

### 3.1 Resultats de microscopia

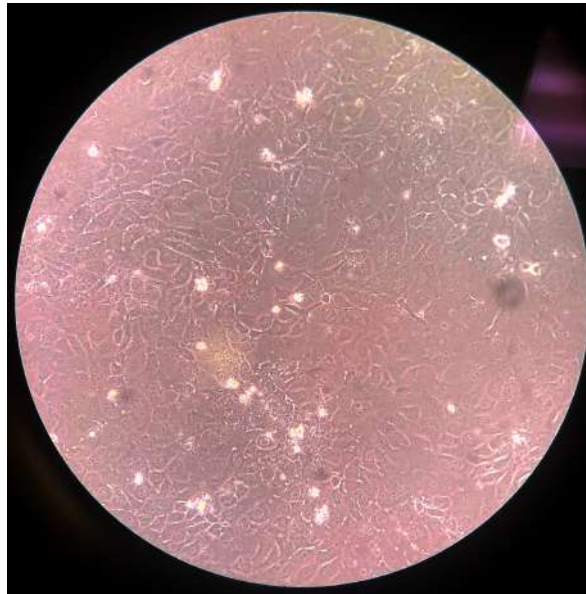
L'observació de les cèl·lules canceroses (tant les tractades com les no tractades) pel microscopi òptic van permetre observar algunes diferències entre les mostres:

Placa no tractada (control o no treatment):



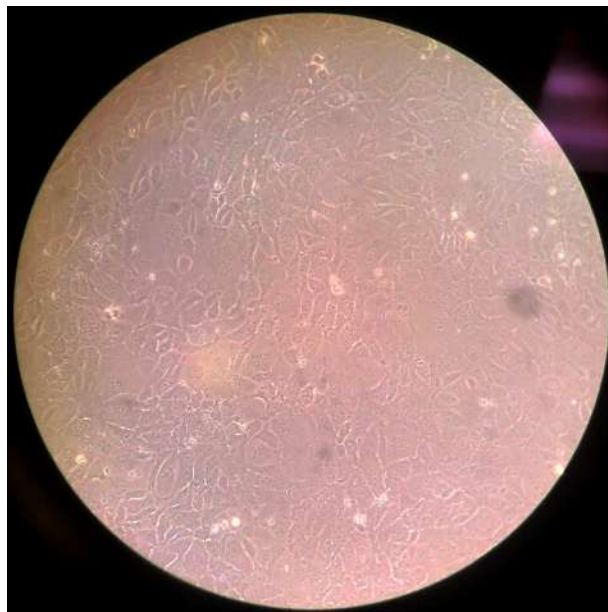
**Figura 39:** Imatge microscopi òptic placa no tractada (20X) (Font: Pròpia).

Es pot veure com les cèl·lules canceroses estan majoritàriament vives i hi ha cèl·lules en totes les fases del cicle cel·lular. Tot i observar una lleugera mort cel·lular (punts més blancs), no es considera anormal perquè, de forma natural, en els teixits hi ha un determinat ritme de mort cel·lular espontània.

Placa tractada amb Cisplatí (Cisplatin):

**Figura 40:** Imatge microscòpi òptic placa amb Cisplatí (20X) (Font: Pròpia).

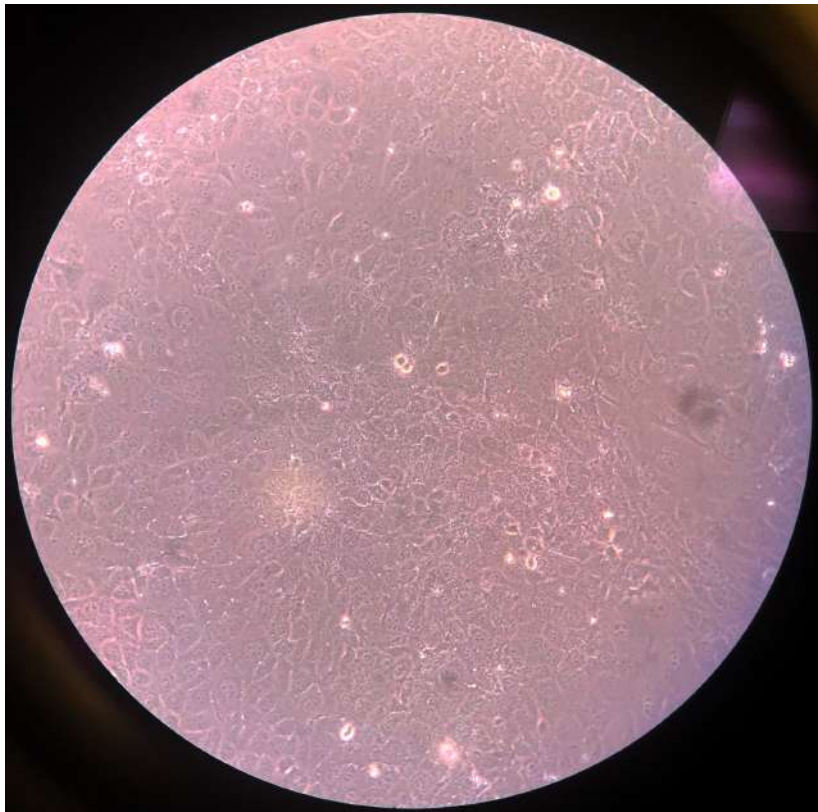
En aquesta mostra s'observa més mort cel·lular, ja que es poden veure més punts blancs al llarg de la placa. Aquests punts blancs són les cèl·lules mortes que s'han desenganxat de la placa i per això es mostren blanques. Això seria un primer indicatiu que el fàrmac ha funcionat, però la confirmació de si ha parat el cicle cel·lular de les cèl·lules, i en quin punt, es coneixerà amb els resultats de la citometria de flux.

Placa tractada amb inhibidor de CDK (CDKi):

**Figura 41:** Imatge microscòpi òptic placa amb inhibidor de CDK (20X) (Font: Pròpia).

Aquesta placa va ser tractada amb inhibidors del cicle cel·lular. A través del microscopi es pot veure més mort cel·lular que la no tractada, però menys que amb la teràpia de Cisplatí. Això ja seria un primer indicatiu que el fàrmac ha funcionat, però si ha parat el cicle cel·lular de les cèl·lules i en quin punt, es veuran també amb els resultats de la citometria de flux.

Placa tractada amb inhibidor de CDK release (CDKi release):



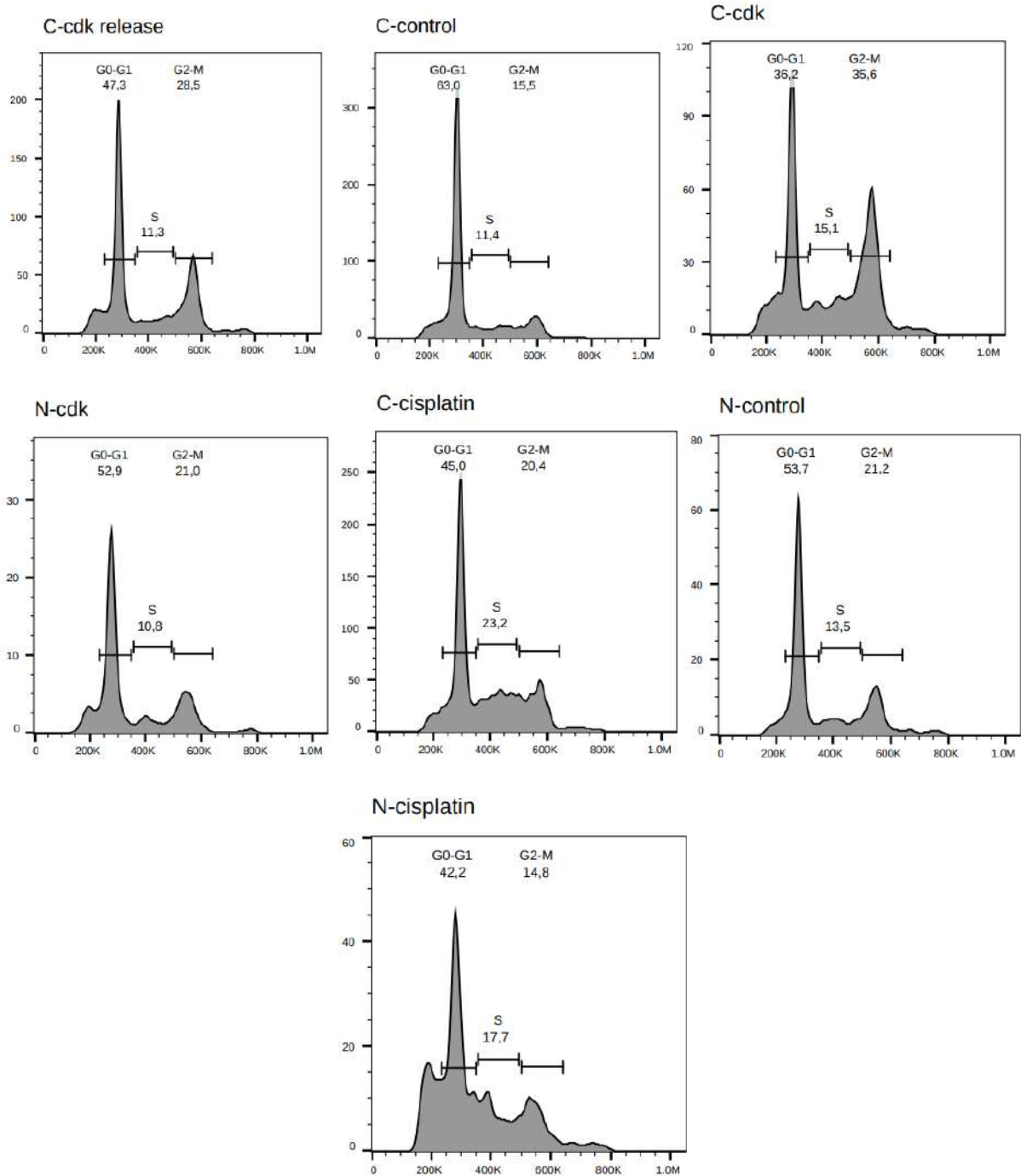
**Figura 42:** Imatge microscopi òptic placa amb inhibidor de CDK release (20X) (Font: Pròpia).

Aquesta placa va ser tractada amb inhibidors de CDK, però dues hores abans d'analitzar la placa amb citometria de flux, es va canviar el medi amb inhibidors de CDK per medi normal. Aquest procediment es va realitzar per observar si les cèl·lules, tot i haver estat tractades amb una teràpia que atura el cicle cel·lular, es poden recuperar i continuar el cicle cel·lular estant dues hores amb medi. Comparant les dues imatges del microscopi (de CDKi i de CDKi release), ja es poden veure algunes diferències entre les dues plaques: mentre que a la placa de CDKi només es podia observar mort cel·lular, al centre d'aquesta placa hi ha una cèl·lula en mitosi, és a dir, s'ha aconseguit dividir quan s'ha tret el fàrmac i afegit el medi.



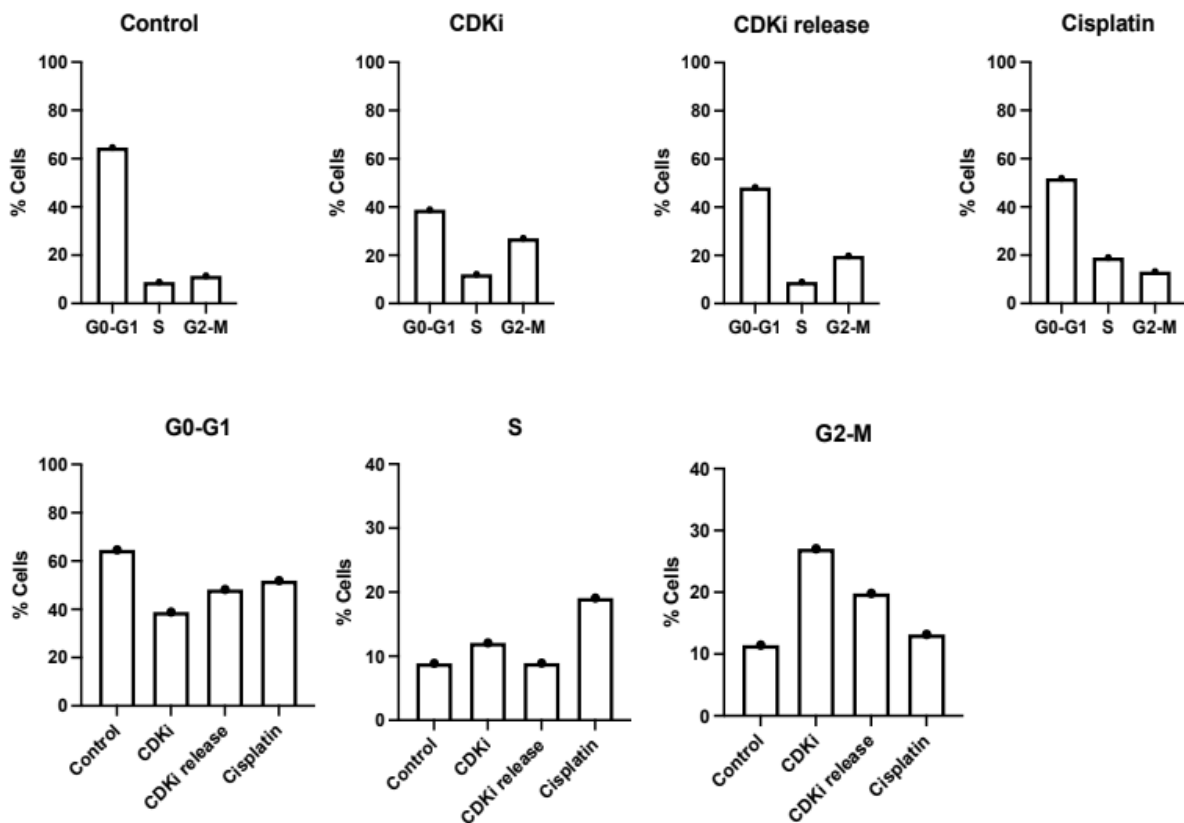
### 3.2 Resultats de la citometria de flux

A partir de la citometria de flux hem obtingut uns historiohistogrames per cada placa amb els percentatges de cèl·lules en cada fase del cicle. Aquest percentatge va ser calculat a partir de la quantitat de iodur de propidi captat pel làser de cada cèl·lula:



A partir d'aquestes dades, s'han creat gràfiques amb el programa FlowJo per veure les diferències entre grups d'intervenció i temps d'incubació, pel que fa a la proporció de cèl·lules en les diferents fases del cicle cel·lular. Hi ha dues gràfiques depenent del temps d'incubació de les cèl·lules:

### 3.2.1 Tractament cèl·lules de 14 hores amb CDKi i cisplatin

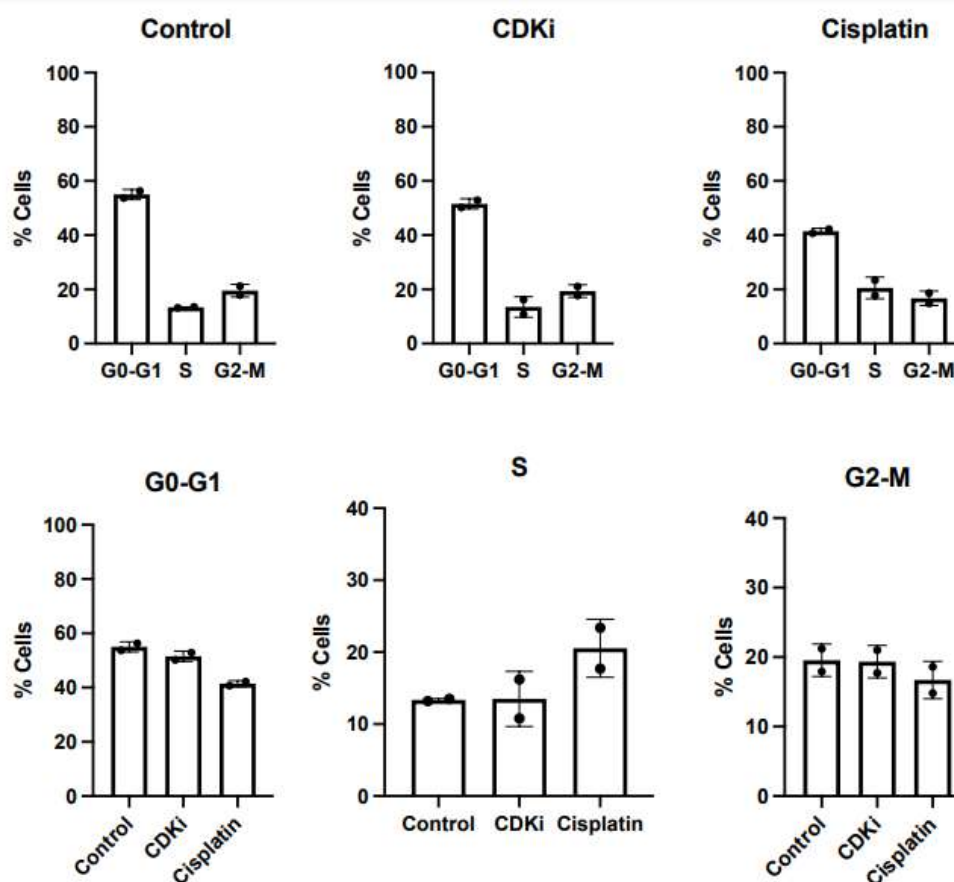


**Figura 43:** Gràfiques del cicle cel·lular de les plaques de 14 hores d'incubació (Font: Pròpia)

A la part superior, es poden veure els diagrames lineals de la quantitat de cèl·lules que estaven en cada fase a les diferents plaques (control, inhibidor de CDK, inhibidor de CDK release i Cisplatin). En canvi, a la part inferior es troben els diagrames lineals de la comparativa de la quantitat de cèl·lules en una fase específica de-cadascuna de les diferents plaques (quantitat que estaven en G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>, en S o en G<sub>2</sub>-M).

- Control: En la placa no tractada, la majoria de cèl·lules tumorals es troben en fase  $G_0-G_1$ , ja que en el cicle cel·lular, la fase  $G_1$  és la més llarga. La quantitat de cèl·lules en fase S i  $G_2-M$  és més baixa, ja que aquestes fases són més curtes en el cicle cel·lular.
- Inhibidor de CDK (CDKi): La quantitat de cèl·lules en fase  $G_2-M$  és més elevada comparat amb les altres plaques, però especialment amb el CDKi release. Aquest és el resultat esperat, ja que la CDK1 és necessària per passar de  $G_2$  a M, de manera que inhibint aquesta proteïna amb RO-3306 hem provocat que el cicle d'aquestes cèl·lules s'aturi en fase  $G_2-M$  i, per tant, que les cèl·lules s'arrestin a  $G_2$ . Confirmant aquest fet, també observem com ha disminuït la quantitat de cèl·lules en  $G_0-G_1$ , ja que s'han quedat parades abans de completar el cicle cel·lular i no han pogut tornar a assolir la fase  $G_1$ .
- Inhibidor de CDK release (CDKi release): En la gràfica d'aquesta placa, també s'hauria de veure un augment de cèl·lules en fase  $G_2-M$  perquè s'ha afegit el mateix inhibidor que en CDKi. Però, com que en aquesta placa se li va treure l'inhibidor de CDK dues hores abans d'analitzar-la, es poden observar alguns canvis respecte a la placa de CDKi. El nombre de cèl·lules en fase  $G_2-M$  continua sent elevat però no tant com en CDKi. A més, les cèl·lules en  $G_0-G_1$  també han augmentat respecte a la placa de CDKi. Això es deu a les hores de medi que ha tingut la placa, amb aquestes hores les cèl·lules han pogut recuperar el cicle cel·lular perquè no estaven sotmeses a l'efecte de l'inhibidor i han pogut passar de la fase  $G_2-M$  a  $G_0-G_1$ , és a dir, s'han dividit.
- Teràpia amb Cisplatí (Cisplatin): La teràpia amb Cisplatí inhibeix la duplicació de l'ADN de les cèl·lules. És per aquest motiu que la gràfica mostra un augment de cèl·lules en fase S (quan té lloc la duplicació de l'ADN). Al no tenir, l'ADN duplicat les cèl·lules no poden superar la fase S del cicle cel·lular, per tant, no poden arribar a fases superiors del cicle ( $G_2$  i M). Com que cèl·lules no han pogut avançar més fases del cicle hi ha hagut una disminució de cèl·lules en les fases  $G_0-G_1$  i  $G_2-M$  comparat amb la placa no tractada.

## 3.2.2 Tractament cèl·lules de 24 hores amb CDKi i cisplatin



**Figura 44:** Gràfiques del cicle cel·lular de les plaques de 24 hores d'incubació (Font: Pròpia)

- Control: Igual que a les cèl·lules tumorals de 14 hores d'incubació, la placa no tractada té la majoria de cèl·lules en fase  $G_0$ - $G_1$ , fet que demostra que la placa no està contaminada per cap altra substància o microorganisme.
- Inhibidor de CDK (CDKi): Les cèl·lules tumorals tractades amb CDKi de 24 hores d'incubació s'han comportat de la mateixa manera que les cèl·lules de 14 hores d'incubació tractades amb CDKi. Les dues plaques mostren un augment de cèl·lules en fase  $G_2$ -M a causa de la inhibició de l'enzim cinasa 1 que inhibeix el pas de la fase  $G_2$  a M.
- Teràpia amb Cisplatí (Cisplatin): S'ha confirmat l'augment de cèl·lules en fase S ja observat a les 14 hores, perquè és un tractament que bloqueja la duplicació de l'ADN que té lloc en aquesta fase.

Si es comparen les gràfiques de les plaques de 14 hores amb les de 24 hores, els resultats de les plaques i de l'efecte dels fàrmacs es veu molt més clar en les de 14 hores d'incubació. Això pot ser degut al fet que les cèl·lules de les plaques de 24 hores d'incubació, com que han estat més temps amb els fàrmacs, directament ja hagin mort i no es mostrin en aquestes gràfiques perquè no pertanyen a cap fase del cicle cel·lular. També pot ser que les cèl·lules tumorals, donades les seves característiques, s'hagin adaptat a la presència de l'inhibidor i hagin desenvolupat mecanismes de resistència als inhibidors.

En resum, els diferents resultats obtinguts amb citometria de flux són compatibles als esperats segons els mecanismes d'acció atribuïts als fàrmacs analitzats.

### 3.3 Cèl·lules mortes

La citometria de flux no permet conèixer, de forma directa, el nombre de cèl·lules mortes de cada placa. En fer una aspiració del PBS, totes les cèl·lules mortes (per tant desenganxades) van ser aspirades i no van ser analitzades pel citòmetre. Per tant, la mort cel·lular només l'hem pogut observar a través del microscopi.

## Conclusions

Durant el projecte, es volia descobrir si aturar el cicle cel·lular de les cèl·lules pot ser un mecanisme efectiu per evitar la progressió del creixement tumoral. Per aconseguir aquest objectiu, s'ha observat l'efecte de l'inhibidor de CDK RO-3306 i de la teràpia amb Cisplatí en el cicle cel·lular de cèl·lules canceroses.

L'estudi s'ha basat a quantificar les cèl·lules de cada placa que es trobaven en cadascuna de les fases del cicle cel·lular, a través de citometria de flux. A més, també s'han observat les plaques amb microscopia. D'aquí se'n desprenen les següents conclusions:

En primer lloc, que els resultats obtinguts corroboren que les accions dels fàrmacs són les que se'ls hi atribueixen, confirmant així la hipòtesi del treball. El cicle cel·lular pot ser aturat en diferents punts segons el fàrmac administrat. *In vitro*, la interrupció del cicle en la fase S induïda pel Cisplatí sembla ser més efectiva per aturar la progressió tumoral que la inhibició de la transició de la fase G<sub>2</sub> a M induïda per l'inhibidor de CDK (RO-3306).

En segon lloc, que s'han pogut complir tots els objectius proposats per aquest treball, tant els concrets de l'estudi com els més generals de l'experiència de veure el dia a dia d'un investigador i el funcionament d'un centre de recerca internacional.

En definitiva, els resultats obtinguts són coherents amb el coneixement disponible fins al moment en aquest àmbit. Aquest fet indica que les tècniques i procediments emprats, així com la seva posada a punt, han estat correctes des d'un punt de vista metodològic, malgrat la complexitat del procés experimental.

En aquesta direcció, es podria plantejar una nova línia de recerca per avaluar la toxicitat d'aquests fàrmacs en cèl·lules sanes o per fer experiments amb nous inhibidors del cicle cel·lular. En relació amb aquest últim punt, l'aspiració seria aconseguir un inhibidor del cicle cel·lular que aturés de forma selectiva i irreversible el cicle cel·lular dels diferents tipus de cèl·lules tumorals, fet que permetria disposar d'un tractament universal per a tots els tipus de càncers existents.

## Bibliografia i webgrafia

### Llibres

1. ALBERTS, Bruce et al. *Biología molecular de la celula*. 6a edició. Barcelona: Omega, 2016, 1472 pàgines. ISBN: 978-84-282-1638-8.
2. UGEDO UCAR, Luis; JIMENO FERNANDEZ, Antonio. *Biología 1 Batxillerat*. 1a edició. Barcelona: Grup Promotor, 2008, 272 pàgines. ISBN: 978-8479183349.

### Articles

1. COLLINS, Kathleen; JACKS, Tyler; PAVLETICH, Nikola. <<The cell cycle and cancer>>. *PNAS*, 1 d'abril 1997, p. 3.
2. C. MILLS, Christopher; KOLB, EA; B. SAMPSON, Valerie. <<Recent Advances of Cell-Cycle Inhibitor Therapies for Pediatric Cancer>>. *AACR*, Desembre 2017, p. 11.
3. DICKSON, M.A; SCHWARTZ, G.K. <<Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy>>. *PMC*, 15 de març 2009, p. 8.
4. OTTO, Tobias; SICINSKI, Piotr. <<Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy>>. *PMC*, 27 de gener 2017, p. 60.
5. PREVO, Remko et al. <<CDK1 inhibition sensitizes normal cells to DNA damage in a cell cycle dependent manner>>. *PubMed.gov*, 25 de juliol 2018, p. 1.
6. SIMMONS, Hannah. <<What Are Cyclins?>>. *News Medical*, 23 d'agost, 2018, p. 2.
7. WU, Song; ZHU, Wei; THOMPSON, Patricia; A HANNUN, Yusuf. <<Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors>>. *PMC*, 28 d'agost 2018, p. 12.

## Pàgines web

1. AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cómo se usa la radioterapia para tratar el cáncer* [en línia].  
<<https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/radioterapia/conceptos-basicos.html>> [Consulta: 2 de jul. 2021].
2. CANCER.NET. *Qué es la inmunoterapia* [en línia].  
<<https://www.cancer.net/inmunoterapia/>> [Consulta: 8 d'ag. 2021].
3. INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER. *Citometría de flujo* [en línia].  
<<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/citometria-de-flujo>> [Consulta: 20 d'ag. 2021].
4. INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER. *Terapia hormonal para tratar el cáncer* [en línia].  
<<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/terapia-hormonal>> [Consulta: 4 de set. 2021].
5. KHAN ACADEMY. *Cancer and the cell cycle* [en línia].  
<<https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/cell-communication-and-cell-cycle/regulation-of-cell-cycle/a/cancer>> [Consulta: 4 de set. 2021].
6. KHAN ACADEMY. *Reguladores del ciclo celular* [en línia].  
<<https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/cell-communication-and-cell-cycle/regulation-of-cell-cycle/a/cell-cycle-regulators>> [Consulta: 27 de jul. 2021].
7. MD ANDERSON CANCER CENTER. *Terapia génica* [en línia].  
<<https://mdanderson.es/el-cancer/tratamientos/terapia-genica>> [Consulta: 8 d'ag. 2021].
8. MINISTERIO DE SANIDAD PÚBLICA, SOCIAL E IGUALDAD. *Ficha técnica Cisplatino* [en línia].  
<[https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/62107/FT\\_62107.pdf](https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/62107/FT_62107.pdf)> [Consulta: 20 d'ag. 2021].
9. RUBIO MARTÍN, Carolina. *Análisis preclínico de compuestos con capacidad antitumoral en cáncer urotelial* [en línia].  
<<https://eprints.ucm.es/id/eprint/58090/1/T41529.pdf>> [Consulta: 4 de set. 2021].
10. VADEMECUM. *Cisplatino* [en línia].  
<<https://www.vademecum.es/principios-activos-cisplatino-l01xa01>> [Consulta: 20 d'ag. 2021].